

GILIAN FERNANDO BOURCKHARDT

**O EFEITO DE ELEVADOS NÍVEIS DE HOMOCISTEÍNA  
SOBRE A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO  
CICLO CELULAR E À DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGENICA NO  
DESENVOLVIMENTO DOS MEMBROS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento – PGBCD, do Centro de Ciências Biológicas – CCB, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento. Orientadora: Professora Dra. Evelise Maria Nazari.

FLORIANÓPOLIS  
2013



Bourckhardt, Gilian Fernando

O efeito de elevados níveis de homocisteína sobre a expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular e à diferenciação condrogênica no desenvolvimento dos membros / Gilian Fernando Bourckhardt ; orientadora Evelise Maria Nazari - Florianópolis, SC, 2013. 62 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Homocisteína. 3. Proliferação Celular. 4. Diferenciação Celular. 5. Embrião de Galinha. I. Nazari, Evelise Maria. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. I. Título.



**"O efeito de elevados níveis de homosisteína sobre a expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular e à diferenciação condrogênica no desenvolvimento dos membros"**

por

**Gilian Fernando Bourckhardt**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 009/PPGBCD/2013) do Programa de Pós-Graduação de Biologia Celular e do Desenvolvimento – UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Orientador:

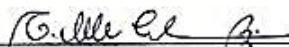


**Prof. Dr. Evelise Maria Nazari**

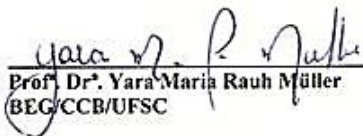
Comissão Examinadora:



**Prof. Dr. Silvana Allodi**  
**IBCCF/CCS/UFRJ**



**Prof. Dr. Michelle Tillman Bis**  
**MOR/CCB/UFSC**



**Prof. Dr. Yara Maria Rauh Müller**  
**BEG/CCB/UFSC**



**Prof. Dr. Yara Maria Rauh Müller**  
**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento**

**Florianópolis, 12 de agosto de 2013.**



Dedico esta conquista a mulher a qual tenho amor incondicional e que me ensinou a acreditar na minha capacidade para realização de mais este sonho: minha mãe!





## **AGRADECIMENTOS**

É tão bom chegarmos a conclusão de uma etapa e vermos que não seguimos sozinhos e que por isso temos muito a agradecer. Agradecer por momentos compartilhados que fizeram desta etapa algo único, inesquecível. Cidade nova, realidade nova, universidade nova, pessoas novas e especiais que entraram e com certeza permanecerão em minha vida!

Nada seria possível se não tivéssemos pessoas conosco, não vivemos sozinhos, não construímos nada sozinhos, talvez esta seja a mais complexa e ao mesmo tempo bela responsabilidade da nossa existência! Saber ouvir, respeitar, se impor e aceitar as diferenças, grande aprendizado este! Hoje posso dizer que sou uma pessoa melhor, porque não cheguei até aqui sozinho, nós chegamos!

Inicialmente, gostaria de agradecer a CAPES pelo apoio financeiro, importante para execução deste trabalho.

Esta conquista só foi possível porque alguém acreditou e apostou em mim, me orientou, me conduziu e me direcionou. Não ganhei uma orientadora, ganhei uma amiga, uma “mãe” sempre pronta, sempre disposta, sempre preocupada, sempre zelosa, sempre muito paciente! Das suas chamadas de atenção aos seus incentivos, sempre muito sábia, sempre muito carinhosa! Aprendi a ser profissional, aprendi a ser pessoa! Sem dúvida uma inspiração! Espero pelo menos em parte, ter um dia a sua competência profissional, Obrigado Evelise!

Quero agradecer uma pessoa na qual também sempre admirei pela sua retidão, pela sua generosidade, pelo seu profissionalismo, pela paciência e por poder compartilhar momentos de trabalho cooperativo e momentos divertidos, Karoline sempre terá um lugar especial no meu coração, obrigado!

Outra inspiração pra mim, minha professora, minha “mãe”, minha amiga, minha companheira de momentos de estudo e de lazer, dos incansáveis passeios às compras! Foi graças a seu estímulo e por acreditar no meu potencial que estou aqui, agora colegas, obrigado Neide “lindinha”!

À minha dupla imbatível, ao meu Robin, a minha Zeni, Zezé, pelos momentos compartilhados e os que compartilharemos. Com certeza, sem você nada teria a mesma cor, o mesmo gosto! Das horas de desespero as horas descontraídas, mesmo que suas piadas ainda não tenham tanta graça (hehe)! Com certeza só em Meleiro iria encontrar uma pessoa tão especial, tão doce... São tantos “tão” impossível mencionar! Só posso agradecer pelo coleguismo, pela amizade e pelas ajudas! Obrigado Eliane, és especial!

Aos demais colegas de laboratório, obrigado por me aturarem nos momentos de muito trabalho, de mau humor, de euforia, de preocupação, de descontração... Família de todo dia a qual cultivo um carinho especial, único que se renova a cada dia, muito obrigado! E como diria a professora Yara: “vamos pra frente!”.

A minha família (mamãe, tia e vovó) razão do meu viver, meu alicerce, a quem atribuo todos meus sucessos como pessoa e como profissional, a quem nunca mediu esforços para que eu

chegasse até aqui e para que eu siga à frente, a quem dedico um amor imensurável, obrigado!

A minha outra família parte de mim, que os laços foram aumentados, Thaís, João Augusto, aos pequenos Pedro e Bernardo, eu só posso dizer que vocês são a tradução do amor! Admiro-os e me sinto muito feliz, muito completo por saber que existem! Obrigado, amo vocês!

A minha família daqui, Luiza, pessoa que me acolheu! Com a qual estabeleci uma relação de irmão! Irmã que a vida me deu, pessoa única, autêntica, firme em suas opiniões, mas que ao mesmo tempo é dona de uma doçura, de um carinho, de um amor e de uma gargalhada muito gostosa, te amo! Muito obrigado!

A minha belinha (Gislaine), pelas conversas, pelos conselhos, pelas gargalhadas, pelos carinhos, pelos passeios, enfim, por ser meu “eu” mais feminino (hehe)! Gosto tanto que vim atrás de você minha little, te amo! Obrigado!

A uma pessoa que conheci aqui, relativamente a pouco tempo, mas que isso não foi obstáculo para o estabelecimento de uma linda amizade! Aos momentos de estudo, aos momentos de descontração, todos são inesquecíveis e infinitamente agradáveis ao seu lado meu “Lulu” (Lucas), obrigado! Está bem, eu assumo, não sei viver sem você (hehehe)!

A minha amiga/irmã pessoa especial, Simone, que agora não é mais “pessoa” são “pessoas”! Você também é minha razão de viver, minha alegria, meu estímulo, te amo! Obrigado!

Aos demais amigos pelos momentos compartilhados, pelo companheirismo dedicado... Impossível mencionar todos, não

quero/posso esquecer ninguém! Tenho um carinho especial a cada um! Dedico um amor puro, incondicional, obrigado!

Enfim, a todos que de uma forma ou de outra me deram força e que contribuíram para realização deste sonho, muito obrigado!

*“Não me deem fórmulas certas, por que eu não espero acertar sempre. Não me mostrem o que esperam de mim, por que vou seguir meu coração! Não me façam ser quem não sou. Não me convidem a ser igual, por que sinceramente sou diferente! Não sei amar pela metade. Não sei viver de mentira. Não sei voar com os pés no chão. Sou sempre eu mesma, mas com certeza não serei a mesma para sempre!”*

*Clarice Lispector*



## RESUMO

Elevados níveis de homocisteína (Hcy) caracterizam a condição metabólica chamada de hiperhomocisteinemia, a qual é resultante da deficiência nutricional de ácido fólico (AF). Esta condição pode induzir danos ao DNA, parada do ciclo e alterações na diferenciação celular, devido à não-remetilação de Hcy para metionina. O objetivo deste estudo foi investigar se elevados níveis de Hcy interferem no processo de formação dos elementos cartilaginosos durante o desenvolvimento dos membros, especificamente na expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular e à diferenciação condrogênica. Para tal, embriões de *Gallus domesticus* foram tratados com dois dias de incubação (E2) com 20 µmol D-L Hcy/50 µL salina e analisados com seis dias de incubação (E6). Embriões do grupo controle foram tratados somente com 50 µL de solução de salina. Para identificar as células em proliferação, bem como as proteínas envolvidas no ciclo celular foram realizadas análises por imuno-histoquímica e citometria de fluxo, utilizando anticorpos anti-fosfohistona H3 (marcador mitótico), anti-p53, anti-p21 e anti-PCNA. Do mesmo modo, para identificar a diferenciação celular foram realizados imunolocalização e análises de citometria de fluxo utilizando anticorpos anti-Pax1, anti-Pax9, anti-Sox9 e anti-VCAM-1. Análises complementares por citometria de fluxo foram realizadas para identificar as células apoptóticas utilizando os anticorpos anti-Bak e anti-Bcl2. Não foram observadas diferenças significativas na taxa de proliferação celular entre embriões controle e tratados com Hcy. Por outro lado, o tratamento com Hcy induziu a uma redução na expressão das proteínas PCNA e p21, as quais estão envolvidas no reparo do DNA e na progressão da fase G1 do ciclo celular, respectivamente. Além disso, o tratamento com Hcy também induziu nas células mesenquimais um aumento na expressão da proteína p53, bem como um aumento na expressão das proteínas Bak (pró-apoptótica) e Bcl2 (antiapoptótica). Para diferenciação celular, houve uma redução na expressão dos produtos gênicos de Pax1, Pax9 e Sox9 nos embriões tratados com Hcy. Por fim, a expressão da molécula de adesão vascular VCAM-1 foi reduzida após exposição a elevados níveis de Hcy. As alterações no ciclo, na diferenciação, bem como na molécula de adesão celular vascular observadas no presente estudo, podem estar relacionadas com as frequências de anomalias congênitas em membros, após exposição a elevados níveis de Hcy.

Palavras-chave: Homocisteína; Ácido Fólico; Proliferação Celular; Diferenciação Celular; Embrião de Galinha.





## ABSTRACT

High homocysteine (Hcy) levels characterize the metabolic condition named hyperhomocysteinemia, which results from nutritional deficiency of folic acid (FA). This condition can induce DNA damage, cell cycle arrest and changes in differentiation, due to non-remethylation of the homocysteine to methionine. The aim of this study was to investigate whether high levels of Hcy interfere in the formation of the cartilaginous elements, during the limb development, focusing in the expression of proteins related to the cell cycle and chondrogenic differentiation. Thus, embryos of *Gallus domesticus* were treated at two days of incubation (E2) with 20  $\mu$ mol DL Hcy/50  $\mu$ L saline and analyzed at six days of incubation (E6). Control embryos were only treated with 50  $\mu$ L saline. To identify the proliferating cells, as well as, the proteins involved in the cell cycle, immunohistochemistry and flow cytometry using antibodies anti-phosphohistone H3 (mitotic marker), anti-p53, anti-p21 and anti-PCNA were performed. Also, to identify the cell differentiation, immunolocalization and flow cytometry analyses using antibodies anti-Pax1, anti-Pax9, anti-Sox9 and anti-VCAM-1 were performed. Additional analyses by flow cytometry were conducted to identify the apoptotic cells using antibodies anti-Bak and anti-Bcl2. No significant differences on cell proliferation rate were observed between control and Hcy-treated embryos. On the other hand, Hcy-treatment induced a reduction of the expression of PCNA and p21 proteins, which are involved in DNA repair and in progression of G1 phase of cell cycle, respectively. Furthermore, Hcy treatment also induced an increase of the p53 protein expression, as well as an increase in the expression of proteins Bak (pro-apoptotic) and Bcl 2 (anti-apoptotic) in the mesenchymal cells. For cell differentiation there was a reduction in the expression of gene products of Pax1, Pax9, and Sox9 in Hcy-treated embryos. Finally, the expression of vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) was reduced after exposure to high levels of Hcy. Changes in cell cycle, differentiation, as well as, in vascular cell adhesion molecule observed in this study may be related to the frequency of limb congenital anomalies, after exposure to high levels of Hcy.

**Keywords:** Homocysteine, Folic Acid, Cell Proliferation; Cell Differentiation; Chick Embryo.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do processo de formação inicial dos brotos dos membros em tetrápodes.....	30
Figura 2: Representação do broto do membro em tetrápode.....	31
Figura 3: Representação esquemática das regiões dos membros anteriores e posteriores. ....	32
Figura 4: Esquema do processo de ossificação endocondral. A) Células mesenquimais precursoras ósseas que migram .....	36
Figura 5: Representação da metodologia empregada para a análise quantitativa das marcações celulares.....	51
Figura 6: Organograma da metodologia empregada .....	53
Figura 7: Morfologia corporal dos embriões de <i>G. domesticus</i> em E6, destacando as anomalias dos membros anteriores. ....	56
Figura 8: Organização morfológica e dos elementos cartilaginosos dos membros anteriores e posteriores.....	57
Figura 9: Imunolocalização da proteína PHH3 em membros anteriores .....	59
Figura 10: Imunolocalização da proteína PHH3 em membros posteriores .....	60
Figura 11: Densidade numérica por área (NA) das células reativas para fosfohistona H3 (PHH3). ....	62
Figura 12: Imunomarcção utilizando o anticorpo anti-p21 .....	64
Figura 13: Imunolocalização da proteína PCNA .....	65
Figura 14: Imunomarcção utilizando o anticorpo anti-p53.....	66
Figura 15: Quantificação das proteínas do ciclo celular p21, PCNA e p53 por citometria de fluxo .....	68
Figura 16: Imunomarcção utilizando o anticorpo anti-Pax1.....	71
Figura 17: Imunolocalização utilizando o anticorpo anti-Pax9.....	72
Figura 18: Imunomarcção utilizando o anticorpo anti-Sox9.....	73
Figura 19: Quantificação dos produtos gênicos de Pax1, Pax9, e Sox9 por citometria de fluxo .....	75
Figura 20: Quantificação da expressão de VCAM-1 por citometria de fluxo .....	76
Figura 21: Quantificação da expressão das proteínas Bak e Bcl2 por citometria de fluxo.....	78
Figura 22: Esquema das interferências induzidas por elevados níveis de Hcy na expressão de proteínas do ciclo celular e da diferenciação condrogênica.....	79



**LISTA DE QUADROS**

Quadro 1: Organização dos grupos experimentais adotados no presente estudo. ....46

Quadro 2: Anticorpos primários utilizados nas análises por imuno-histoquímica e citometria de fluxo. .... 49

Quadro 3: Anticorpos secundários utilizados nas análises por imuno-histoquímica e citometria de fluxo. ....50

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Quantificações da imunolocalização da expressão da proteína PHH3. .... 61

Tabela 2: Interferência de elevados níveis de Hcy na expressão de proteínas do ciclo celular e da diferenciação condrogênica..... 80



## LISTA DE ABREVIATURAS

A/P	Ântero-Posterior
AF	Ácido Fólico
Bak	do inglês <i>Bcl2-antagonist killer</i>
Bax	do inglês <i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl2	do inglês <i>B-cell lymphoma 2</i>
BMP	Proteína morfogenética óssea (do inglês <i>bone morphogenetic protein</i> )
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês <i>bovine serum albumin</i> )
Cdk	do inglês <i>cyclin-dependent kinases</i>
CEA	Crista Ectodérmica Apical
D/V	Dorso-Ventral
DAB	do inglês 3,3'- <i>Diaminobenzidine</i>
DAPI	do inglês 4',6'- <i>Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride</i>
Hcy	Homocisteína, do inglês <i>homocysteine</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DTN	Defeitos do Tubo Neural
E	Dia embrionário
Fgf	Fator de crescimento fibroblástico (do inglês <i>fibroblast growth factor</i> )
HE	Hematoxilina e Eosina
HMG	do inglês <i>high mobility group</i>
ICAM-1	do inglês <i>intercellular cell adhesion molecule-1</i>
IgG	Imunoglobulina G
MEC	Matriz Extracelular
MRF	Fator regulatório miogênico (do inglês <i>myogenic regulatory factor</i> )
NA	Densidade numérica de células por área
N-CAM	Molécula de adesão celular neuronal (do inglês <i>neural cell adhesion molecule</i> )
P/D	Próximo-Distal
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>phosphate buffered saline</i> )
PCNA	do inglês <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PHH3	Fosfo-histona H3(do inglês <i>phospho histone H3</i> )
RNA	Ácido Ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic acid</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês <i>reactive oxygen species</i> )
Runx	do inglês <i>runt-related transcription factor</i>
Shh	do inglês <i>sonic hedgehog</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SSC-A	do inglês <i>side scatter</i>

Tbx	do inglês <i>T-box proteins</i>
TGF	Fator de crescimento transformante (do inglês <i>transforming growth factor</i> )
VCAM-1	do inglês <i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>
Wnt	do inglês <i>wingless</i>
ZAP	Zona de Atividade Polarizadora
ZP	Zona de Progressão



# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	27
1.1 HIPERHOMOCISTEINEMIA COMO FATOR DE RISCO PARA O APARECIMENTO DE ANOMALIAS CONGÊNITAS.....	27
1.2 DESENVOLVIMENTO DOS MEMBROS EM TETRÁPODES.....	29
1.3 FORMAÇÃO DE CARTILAGENS E OSSOS NOS MEMBROS.....	34
1.3.1 A expressão de genes Pax no desenvolvimento de membros em tetrápodes .....	36
1.3.2 Expressão de Sox9 durante o desenvolvimento esquelético.....	39
1.4 HIPERHOMOCISTEINEMIA E O PROCESSO DE OSSIFICAÇÃO ENDOCONDRAIS DOS MEMBROS EM TETRÁPODES .....	40
2 OBJETIVOS.....	43
2.1 GERAL .....	43
2.2 ESPECÍFICOS .....	43
3. METODOLOGIA .....	45
3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	45
3.2 ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	45
3.3 PREPARO DOS EMBRIÕES PARA ANÁLISES MICROSCÓPICAS.....	46
3.4 MARCAÇÕES CELULARES POR IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	47
3.5 ANÁLISE QUANTITATIVA DAS MARCAÇÕES CELULARES .....	50
3.6 CITOMETRIA DE FLUXO .....	51
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	52
4. RESULTADOS .....	55
4.1 ANÁLISE DA MORFOLOGIA EXTERNA DOS MEMBROS .....	55
4.2 ANÁLISE MICRO-MORFOLÓGICA DOS MEMBROS .....	56
4.3 ANÁLISES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	58
4.4 ANÁLISES DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR .....	69
4.4.1 Detecção/quantificação das Moléculas de Adesão VCAM-1 .....	76
4.5 ANÁLISES DE APOPTOSE .....	77
4.5.1 Detecção/quantificação das proteínas Bak e Bcl2 .....	77
5. DISCUSSÃO .....	81
6. CONCLUSÃO .....	25
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 HIPERHOMOCISTEINEMIA COMO FATOR DE RISCO PARA O APARECIMENTO DE ANOMALIAS CONGÊNITAS

O aumento dos níveis plasmáticos do aminoácido homocisteína (Hcy) constitui uma condição conhecida como hiperhomocisteinemia, que pode ser considerada um fator de risco para o aparecimento de anomalias congênitas, incluindo defeitos do tubo neural (DTN), anomalias cardiovasculares, fenda orofacial, anomalias no trato urinário, hidrocefalia congênita e anomalias em membros (Goh et al., 2006).

Hcy é um aminoácido sulfurado, obtido a partir da via biossintética que converte o aminoácido essencial metionina em cisteína. A Hcy é metabolizada a partir de duas vias metabólicas distintas: por remetilação à metionina ou por transulfuração à cisteína (Selhub, 1999).

Especificamente no processo de remetilação, a Hcy adquire grupamentos metil a partir da conversão de 5-metiltetrahidrofolato a tetrahidrofolato pela ação da enzima metionina sintetase, cuja atividade é dependente de ácido fólico (AF). Assim, nesta via metabólica, o AF atua como um fator importante no mecanismo de controle das concentrações intracelulares de Hcy (Mattson et al., 2002; Hague, 2003).

De um modo geral, os organismos animais não são capazes de sintetizar o AF, por isso a principal fonte de incorporação desta vitamina é através da alimentação. Uma dieta rica em AF é

principalmente composta por vegetais folhosos verdes, leguminosas, frutas cítricas, carnes de fígado e rim (Eskes, 1997).

A fortificação da farinha de trigo com AF é uma realidade para grande parte da população mundial. De acordo com os dados do *Centers for Disease Control and Prevention* (2008), estima-se que de 2004 a 2007 houve uma expansão nos programas de acesso aos farináceos enriquecidos com AF, passando de 18% para 27%, o que representa um aumento de 540 milhões de pessoas consumindo alimentos fortificados. A porção de farinha de trigo fortificada aumentou de 90% para 97% nas Américas, de 26% para 31% na África, de 16% para 21% na Ásia, de 3% a 6% na Europa, e de 2% para 4% na região do Pacífico Ocidental.

Nas condições de acúmulo intracelular de Hcy são frequentes situações de estresse oxidativo e alterações no processo de síntese de proteínas e lipídeos, bem como de danos ao DNA induzidos pela não-remetilação de Hcy à metionina. Essas situações afetam diretamente os mecanismos de proliferação, diferenciação e apoptose (Oikawa et al., 2003; Ivanov et al., 2007). Nos processos de proliferação e diferenciação celular, ocorrem ciclos contínuos de replicação do DNA, por isso uma falha ou mudança no processo de metilação, pode ser mantida. Quando o dano ao DNA é muito extenso para ser reparado, a apoptose pode ser desencadeada, mediada por p53, que por sua vez ativa um programa transcricional, que induz a expressão de genes pró-apoptóticos, como Bax e Bak (Waterland, 2006).

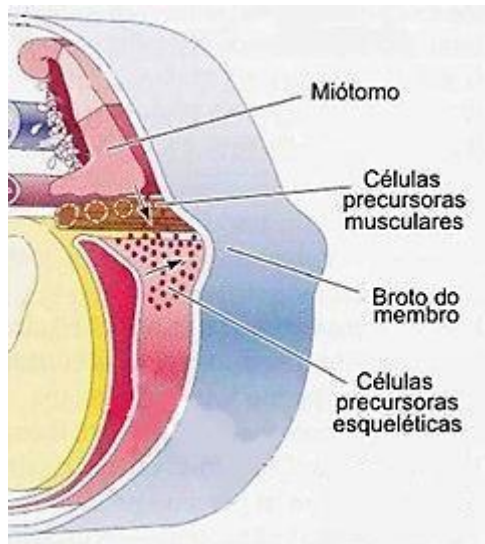
De um modo geral, a incorporação de AF parece proteger as células, evitando condições celulares adversas de estresse

oxidativo, de síntese e metilação da cromatina. Este último atua como mecanismo epigenético no controle da proliferação e diferenciação celular durante o desenvolvimento, podendo interferir na formação de estruturas embrionárias, como os membros (Fenech et al., 1998; van Mil et al., 2010).

## 1.2 DESENVOLVIMENTO DOS MEMBROS EM TETRÁPODES

Os embriões de tetrápodes apresentam quatro brotos de membros, dois anteriores e dois posteriores opostos entre si em relação à linha mediana, o que é constantemente mantido pela expressão dos genes *Hox* ao longo do eixo ântero-posterior. Os brotos de membros encontram-se na região de expressão de *Hoxc6*, *Hoxc8* e *Hoxb5* e a informação posicional dos brotos é determinada por fatores de transcrição, *Tbx5* nos membros anteriores, e *Tbx4* e *Pitx1* nos membros posteriores (Camarata et al., 2006).

Após determinada a informação posicional, o processo de desenvolvimento dos membros tem início com a proliferação e migração das células mesenquimais, a partir do mesoderma lateral do dermomiótomo. Tais células proliferam intensamente e se agrupam formando uma protrusão revestida por ectoderma, conhecida como broto do membro (Figura 1) (Martin, 1998).



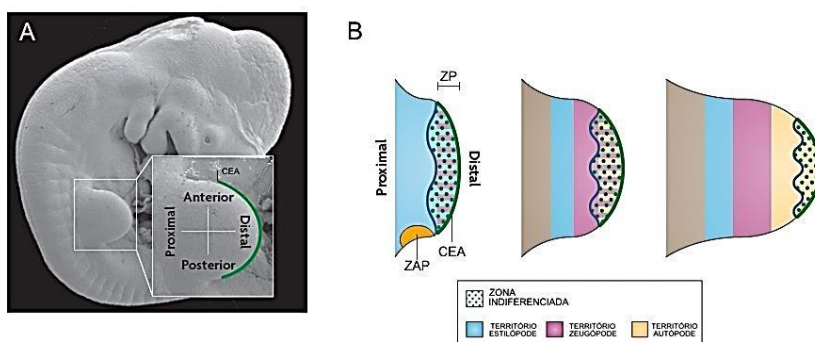
**Figura 1: Representação esquemática do processo de formação inicial dos brotos dos membros em tetrápodes.** Migração das células mesenquimais (setas pretas) precursoras das estruturas musculares derivadas do miótomo e ósseas derivadas do mesoderma lateral. Fonte: Adaptado de Gilbert (2010).

Os brotos dos membros crescem a partir de três eixos principais, o eixo proximal-distal (P/D), o eixo ântero-posterior (A/P) e o eixo dorsoventral (D/V) (Gilbert, 2010) (Figura 2A).

A configuração dos membros anteriores e posteriores basicamente compreende três regiões que vão desde a parede lateral do corpo até a porção distal. Durante a formação, as células mesenquimais passam pelo processo de diferenciação para originar músculos e ossos, que constituirão três segmentos no sentido próximo-distal, chamados de estilópode, zeugópode e autópode (Figura 2B) (Christ e Brand-Saberi, 2002).

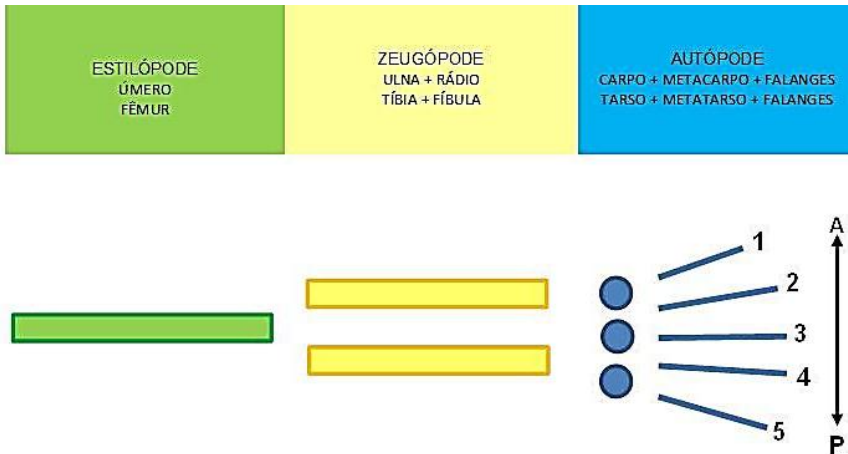
A região do estilópode é constituída por um único elemento esquelético, o úmero (membro anterior) e fêmur (membro posterior);

enquanto que a região do zeugópode é constituída por um ou mais elementos esqueléticos, o rádio e a ulna (membro anterior) e a tíbia e fíbula (membro posterior), que são altamente conservadas entre as espécies. Entretanto, a região do autópode contém elementos esqueléticos formadores dos dígitos, os quais podem variar em número nas diferentes espécies animais (Figura 3) (Hinchliffe, 2002).



**Figura 2: Representação do broto do membro em tetrápode.** A) Imagem de microscopia eletrônica de varredura destacando o broto de membro. B) Esquema com as regiões dos brotos dos membros: CEA (crista ectodérmica apical), ZP (zona de progressão) e ZAP (zona de atividade polarizadora) e as futuras regiões do estilópode, zeugópode e autópode. Fonte: Adaptado de Zeller et al. (2009).

Quando as células mesenquimais do broto do membro passam a secretar a proteína Fgf-10 (do inglês, *fibroblast growth factor*), o ectoderma se diferencia na região apical, formando a crista ectodérmica apical (CEA). A CEA é uma faixa de epitélio colunar pseudoestratificado, que se estende ao longo do eixo D/V, responsável por coordenar a proliferação e diferenciação das células mesenquimais (Fernandez-Teran e Ros, 2008).



**Figura 3: Representação esquemática das regiões dos membros anteriores e posteriores.** Regiões de estilópode (verde), zeugópode (amarelo) e autópode (azul). Números 1, 2, 3, 4 e 5 identificando os dígitos. Setas indicando o eixo Antero/Posterior (A/P). Fonte: o autor.

O desenvolvimento do eixo P/D ocorre pelas interações entre a CEA e as células mesenquimais adjacentes em intensa atividade de proliferação, que formam uma região conhecida como zona de progressão (ZP). Essas interações ocorrem principalmente entre as proteínas Fgf-10, que atua induzindo as proteínas Wnt (do inglês, *wingless*) no ectoderma. Essas proteínas, por sua vez, através da via canônica de  $\beta$ -catenina, induzem a expressão de Fgf-8 na CEA. Fgf-8 estimula a mitose das células mesenquimais da ZP, mantendo a expressão de Fgf-10, dessa maneira, um circuito de retroalimentação é estabelecido entre Fgf-10/Wnt/Fgf-8 durante a padronização do eixo P/D (Martin, 1998).

Na especificação do eixo A/P há uma região de células mesodérmicas, localizada na porção inferior do broto de membro



chamada de zona de atividade polarizadora (ZAP). Essa região secreta a molécula de Shh (do inglês, *sonic hedgehog*) ao longo do eixo A/P, o que confere identidade aos dígitos (Probst et al., 2011).

A região da ZAP atua como reguladora da especificação dos dígitos. Esta especificação depende do intervalo de tempo de exposição ao Shh, bem como da concentração de Shh que atinge as regiões dos dígitos em desenvolvimento. Os dígitos 4 e 5 ficam expostos por um intervalo de tempo mais prolongado a uma concentração maior de Shh. Os dígitos 2 e 3 são expostos por um período menor, enquanto que o dígito 1 é especificado independentemente da exposição ao morfógeno (Figura 3) (Harfe et al., 2004).

Os mecanismos pelos quais Shh estabelece a identidade aos dígitos podem envolver vias de sinalização com a molécula de BMP (do inglês, *bone morphogenetic protein*), importante na regulação da apoptose necessária à regressão das membranas interdigitais (Drossopoulou et al., 2000).

Na formação do eixo D/V, ocorre a distinção entre a metade dorsal e a metade ventral do membro determinados pela polaridade do ectoderma. Essa polaridade é determinada pelas moléculas de Wnt que são expressas somente na porção dorsal do ectoderma nos brotos de membro, induzidas pelas moléculas de Fgf-8 presentes na CEA. Essas moléculas induzem a expressão de fatores indutores da especificação do eixo D/V. Assim, o gene *Lmx-1* é expresso nas células mesenquimais da região dorsal, enquanto que o fator de transcrição *engrailed* é expresso no ectoderma ventral. Esses mecanismos de sinalização são essenciais para a

progressão do crescimento do membro, bem como para formação de músculos e ossos (Altabef e Tickle, 2002).

O desenvolvimento dos músculos ocorre a partir da diferenciação das células precursoras miogênicas, chamadas de mioblastos, originadas na região ventral do dermomiótomo. Essas células migram para o broto do membro e através da ação de fatores parácrinos TGF- $\beta$  (do inglês *transforming growth factor*) passam a sintetizar os fatores de transcrição Myf5 e MyoD (Pownall et al., 2002; Parker et al., 2003).

Os mioblastos migram em blocos pré-musculares mantidos por N-caderinas, que se distribuem nas futuras regiões dorsal e ventral, mantendo a expressão dos genes *Lbx-1* específicos de linhagens precursoras, essenciais para a orientação dessas células (Bentzinger et al., 2012). Os mioblastos fundem-se, pelo aumento na expressão de MRF (do inglês, *myogenic regulatory factor*), induzindo a diferenciação de mioblastos em miócitos, os quais originarão miofibras multinucleadas. Essas miofibras formam as fibras musculares, que constituem os músculos, reguladas pela miostatina, um membro da família de fatores parácrinos TGF- $\beta$  (Christ e Brand-Saberi, 2002).

### 1.3 FORMAÇÃO DE CARTILAGENS E OSSOS NOS MEMBROS

A formação das estruturas ósseas nos membros de tetrápodes ocorre por ossificação endocondral (Figura 4). Esse processo envolve a formação de um molde cartilaginoso, a partir de células mesenquimais provenientes do mesoderma lateral que

subsequentemente será mineralizado à matriz óssea (Mackie et al., 2008).

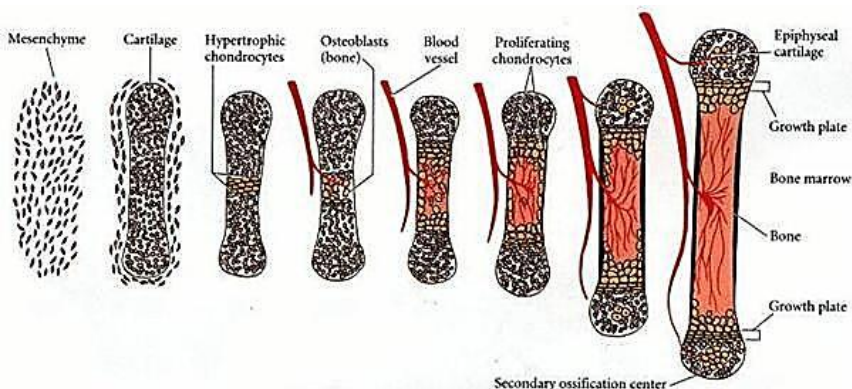
Inicialmente, as células mesenquimais são induzidas por Shh a expressar os fatores de transcrição Pax1 e Pax9, que controlam a proliferação e condensação celular. A partir disso, as células mesenquimais mais condensadas passam a se diferenciar em condrócitos, expressando moléculas de adesão celular e o fator de transcrição Sox9 que tem papel importante na ativação de genes característicos do tecido cartilaginoso, que codificam o colágeno do tipo II (LeClair, 1999).

Posteriormente, os condrócitos passam por intensa atividade de proliferação para formação do molde cartilaginoso e, à medida que se dividem, passam a secretar uma matriz cartilaginosa específica de colágeno do tipo X. Seguindo a proliferação, as células aumentam seu volume drasticamente, tornando-se os chamados condrócitos hipertróficos (Bi et al., 1999).

Os condrócitos hipertróficos alteram a matriz produzindo moléculas de colágeno e fibronectina para permitir a mineralização por fosfato de cálcio, ao mesmo tempo em que Fgf-18 induz a expressão de VEGF (do inglês, *vascular endothelial growth factor*) para formação de vasos sanguíneos (angiogênese) (Hojo et al., 2010).

À medida que as células da região hipertrófica morrem por apoptose, as células que circundam a cartilagem diferenciam-se em osteoblastos em resposta a sinalizações do fator de transcrição Osterix, que por sua vez é ativado por Wnt. O material ósseo é acrescentado perifericamente na superfície interna do periósteo que

é constituída por uma bainha fibrosa que cobre o osso em desenvolvimento. Concomitantemente, há um esvaziamento da região interna do osso, pelos osteoclastos, formando a cavidade da medula óssea (Long e Ornitz, 2013).



**Figura 4: Esquema do processo de ossificação endocondral.** A) Células mesenquimais precursoras ósseas que migram. B) Células mesenquimais compactadas. C) Proliferação dos condrócitos para formação do molde cartilaginoso. D) Hipertrofia dos condrócitos e mineralização da matriz extracelular. E) Entrada dos vasos sanguíneos e dos osteoblastos no molde cartilaginoso. F) Substituição da matriz cartilaginosa pela matriz óssea. G) Formação e crescimento do osso. Proliferação hipertrofia e mineralização da matriz extracelular. Centros de ossificação secundária a medida que os vasos sanguíneos invadem a matriz cartilaginosa. Fonte: Gilbert, 2010.

### 1.3.1 A expressão de genes *Pax* no desenvolvimento de membros em tetrápodes

Os genes *Pax* foram identificados a partir de homologias com a sequência dos genes de segmentação corporal de *Drosophila*. A família destes genes consiste em 9 membros, partilhando um domínio de ligação ao DNA de 128 aminoácidos

comuns, localizado na extremidade NH<sub>2</sub>-terminal (Strachan e Read, 1994).

Esse domínio é altamente conservado dentro dos grupos animais de diferentes espécies. Além desse domínio comum, existe um homeodomínio octapeptídeo que distingue os diferentes membros da família de genes *Pax* (Mansouri et al., 1996).

Durante o desenvolvimento, os genes *Pax* são expressos especificamente num padrão espaço-temporal, e apenas Pax1 e Pax9 são expressos somente em domínios mesenquimais (LeClair, 1999).

Em tetrápodes, Pax1 e Pax9 são essenciais no processo de esqueletogênese axial, apendicular e craniofacial, controlando a migração, maturação e condensação das células mesenquimais nos processos de ossificação. Os mecanismos de regulação dependem da sinalização de Shh, sendo esse expresso na ZAP (Strachan e Read, 1994; LeClair, 1999).

Em aves, a expressão de Pax1 e Pax9 durante o desenvolvimento embrionário é coordenado espaço-temporalmente, tendo seu período de expressão de E3 a E6. No estágio inicial (E3) Pax1 é expresso nos somitos, tronco e cauda. A partir dos estágios E3,5-E4,5 a sua expressão localiza-se na margem anterior dos membros anteriores e posteriores, na região proximal, na junção com a parede lateral do corpo (LeClair, 1999).

Nos estágios E4,5-E5, Pax 1 é expresso em duas faixas dorsoventrais dos membros anteriores e nos rudimentos dos discos intervertebrais. Nos membros posteriores, a expressão localiza-se ainda na região proximal, na junção com a parede lateral do corpo.

No estágio E6 a expressão localiza-se nas áreas distais e na parte posterior do zeugópode (Timmons et al., 1994).

A expressão de Pax9 nos estágios E3-E3,5 localiza-se no esclerótomo, à medida que segue o desenvolvimento nos estágios E4-E4,5 há expressão na margem anterior do broto de membro. Em estágios mais tardios (E5-E5,5), Pax9 é expresso na junção do zeugópode com o autópode, tanto em membros anteriores quanto em membros posteriores. No estágio E6 os sinais de expressão são mais distais e anteriores nas células mesenquimais (Peters, 1998).

Pax1 e Pax9 têm sua expressão controlada de acordo com a origem das células mesenquimais. Por exemplo, nos membros a expressão aparece inicialmente em áreas isoladas e depois se restringem as regiões que circundam as cartilagens, enquanto que nos somitos, expressam-se especificamente no esclerótomo. A expressão também vai ser regulada de acordo com a origem da molécula de sinalização Shh, que nos membros concentram-se na ZAP e no esclerótomo os sinais são provenientes da notocorda (LeClair, 1999).

Mutações ou ausência de expressão dos genes *Pax1* e *Pax9* nas células mesenquimais dos membros em desenvolvimento, podem levar à redução do tamanho ou ainda, à ausência de elementos esqueléticos, bem como à formação de um dígito supranumerário (Peters, 1998) (Strachan e Read, 1994).

### 1.3.2 Expressão de Sox9 durante o desenvolvimento esquelético

Os genes Sox compreendem um grande grupo de genes que codificam fatores de transcrição com funções em muitos processos do desenvolvimento, incluindo a determinação do sexo, indução neural e esqueletogênese. Pertencem à superfamília HMG (do inglês, *high mobility group*), com a capacidade de dobrar o DNA funcionando como “blocos de construção” em complexos multiproteicos ativos (DeLise et al., 2000; Kiefer, 2007).

Sox9 tem papel fundamental na esqueletogênese. Sua expressão é localizada nas células mesenquimais do crânio, no esclerótomo e nas condensações das cartilagens em brotos de membros (DeLise et al., 2000).

Nas células mesenquimais, durante a condrogênese, quando expresso, Sox9 pode ativar diretamente a transcrição de genes necessários para o desenvolvimento da cartilagem, como *col2a1* e *col11a1* (Hall e Miyake, 2000; Kawakami et al., 2005).

Sox9 promove o comprometimento das células mesenquimais a linhagens de condrócitos e osteoblastos. Isso ocorre devido à relação antagonista entre Sox9 e a via canônica de  $\beta$ -catenina sinalizada por Wnt. A expressão estável de  $\beta$ -catenina inibe a diferenciação de condrócitos, quando da ausência de Sox9. Por outro lado, a ausência de expressão de  $\beta$ -catenina promove uma super expressão de Sox9 promovendo um atraso na ossificação endocondral (Day et al., 2005).

Sox9 inibe o fator de transcrição Runx2, um regulador do desenvolvimento de osteoblastos. Quando a expressão de Sox9 é

induzida nos osteoblastos, a expressão de Runx2 é perdida, e o processo de ossificação é alterado. Isso acontece porque Sox9 diminui a afinidade de ligação entre Runx2 e suas sequências alvo (Zhou et al., 2006; Hattori et al., 2010).

Mutações ou ausência de expressão do gene Sox9 no mesênquima indiferenciado podem resultar em anormalidades nas cartilagens, resultando em defeitos de curvatura e angulação de ossos longos e defeitos craniofaciais, ou ainda diminuição do tamanho corporal devido o encurtamento da região colunar e das zonas hipertróficas durante o processo de mineralização da matriz óssea (DeLise et al., 2000; Hall e Miyake, 2000; Bi et al., 2001; Kawakami et al., 2005; Dy et al., 2012).

#### 1.4 HIPERHOMOCISTEINEMIA E O PROCESSO DE OSSIFICAÇÃO ENDOCONDRAIS DOS MEMBROS EM TETRÁPODES

Durante o processo de ossificação endocondral o acúmulo de Hcy pode levar a um atraso no crescimento de ossos longos, principalmente nas porções proximais, isso porque as ligações das moléculas de colágeno são alteradas, interferindo diretamente na formação de ligações cruzadas do colágeno tipo I. Desta maneira, tem-se uma expansão do crescimento com desorganização dos condrócitos hipertróficos, sugerindo um atraso na diferenciação, como resultado uma ossificação endocondral comprometida (Levasseur, 2009).



Essas anomalias nos elementos ósseos podem estar relacionadas à capacidade que elevados níveis de Hcy têm de promover danos ao DNA, o que estimula a expressão de p53 induzindo a célula a duas vias: (i) via de reparo mediado por p21 e PCNA, ou (ii) quando o dano for muito extenso para ser reparado, a via apoptótica ativada pela expressão de genes pró-apoptóticos, como a Bax e Bak (Waterland, 2006).

Elevados níveis plasmáticos de Hcy podem causar DTN e anormalidades no desenvolvimento do mesênquima axial, afetando a distribuição das células do esclerótomo, reduzindo a proliferação celular e alterando a expressão de *Pax1*, *Pax9* e *Sox9* no mesênquima (Kobus et al., 2013).

Existem estudos que demonstram a relação existente entre elevados níveis de Hcy com a ocorrência de danos ao DNA e as consequências para o ciclo celular, e a interferência na expressão dos genes *Pax1*, *Pax9* e *Sox9*, porém grande parte voltada para o sistema nervoso central (SNC). Poucos abordam a interferência de elevados níveis de Hcy na expressão dos genes *Pax1*, *Pax9* e *Sox9* na diferenciação das células mesenquimais a matriz cartilaginosa e da expressão de proteínas do ciclo celular em membros, mesmo que a frequência de aparecimento de anomalias congênitas em membros (43 a 52%) seja mais elevada do que as relacionadas ao SNC (33 a 48%) (Strachan e Read, 1994; Verkleij-Hagoort et al., 2007; van Mil et al., 2010).

Considerando essa maior frequência de anomalias congênitas e os mecanismos celulares a elas associados, o presente estudo teve como foco investigar como condições de

hiperhomocisteinemia podem interferir na expressão das proteínas p21, p53 e PCNA (do inglês, *proliferating cell nuclear antigen*) relacionadas ao ciclo celular, e na expressão dos produtos gênicos de *Pax1*, *Pax9* e *Sox9* na diferenciação condrogênica e como estas alterações podem estar relacionadas com o aparecimento de anomalias congênitas em membros.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

O presente estudo tem por objetivo investigar o efeito de elevados níveis de Hcy no processo de formação dos elementos cartilaginosos durante o desenvolvimento dos membros anteriores e posteriores, especificamente na expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular e de proteínas específicas da diferenciação condrogênica.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito de elevados níveis de Hcy no mecanismo de proliferação celular através da análise da expressão de proteínas envolvidas no ciclo celular como fosfohistona H3, p21, p53 e PCNA;
- Caracterizar a expressão dos produtos dos genes *Pax1*, *Pax9* e *Sox9* no processo de diferenciação condrogênica, em condições experimentais de elevados níveis de Hcy;
- Analisar o efeito de elevados níveis de Hcy na expressão das moléculas de adesão VCAM-1 (do inglês *Vascular cell adhesion protein*);

- Avaliar a expressão das proteínas Bak (pró-apoptótica) e Bcl2 (antiapoptótica) frente a condições de elevados níveis de Hcy;
- Identificar os efeitos de elevados níveis de Hcy nos brotos dos membros anteriores e posteriores, bem como nos brotos dos membros nos lados esquerdo e direito dos embriões.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Neste trabalho foram utilizados embriões de *Gallus domesticus* como modelo de estudo para a investigação dos efeitos da Hcy sobre o desenvolvimento de membros. Para tal, ovos fertilizados foram doados pela empresa Tyson do Brasil Alimentos Ltda - São José/SC. Em laboratório, os ovos foram higienizados com água destilada, pesados e posteriormente incubados em condições controladas de temperatura (37,5°C) e umidade (65%). Diariamente os ovos foram monitorados para verificar a sobrevivência dos embriões.

Os procedimentos adotados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais nº 254/CEUA/UFSC.

#### 3.2 ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Este estudo foi constituído por quatro grupos experimentais (Quadro 1), sendo utilizadas como referência as doses adotadas por Kobus et al. (2013).

Após os tratamentos, os ovos permaneceram na estufa até o 6º dia embrionário (E6), quando os embriões foram crioanestesiados a 4°C, removidos dos ovos e lavados em solução salina 0,9%. Posteriormente, foram observados em estereomicroscópio e

estagiados, de acordo com as características morfológicas (Hamburger e Hamilton, 1951). A idade de estudo E6 foi escolhida pelo fato dos embriões apresentarem membros em processo inicial de desenvolvimento, quando são reconhecidos os moldes cartilagosos nas três regiões do membro. Paralelamente foram observadas alterações morfológicas externas dos membros.

Quadro 1: Organização dos grupos experimentais adotados no presente estudo.

GRUPO	TRATAMENTO	
	E1 (24 horas de incubação)	E2 (48 horas de incubação)
Controle	Salina 0,9%	Salina 0,9%
AF	Salina 0,9%	0,5 µg AF/ 50 µL salina 0,9%
Hcy	Salina 0,9%	20 µmol Hcy/ 50 µL salina 0,9%
AF + Hcy	0,5 µg AF/ 50 µL salina 0,9%	20 µmol Hcy/ 50 µL salina 0,9%

AF: Ácido Fólico Hcy: D,L-homocisteína

### 3.3 PREPARO DOS EMBRIÕES PARA ANÁLISES MICROSCÓPICAS

Os embriões removidos dos ovos foram fixados em formaldeído a 4% por 24 horas e conservados em etanol a 70% à temperatura ambiente. Para realização das análises microscópicas, os membros foram dissecados, desidratados em série etanólica crescente 70% - 100%, incluídos em parafina, posteriormente

seccionados em micrótomo rotativo (6 – 8  $\mu\text{m}$ ), sendo os cortes montados seriadamente em lâminas histológicas. Parte das lâminas foi destinada às técnicas de coloração e parte para a realização das análises por imuno-histoquímica.

Após desparafinização, parte das lâminas foi destinada aos procedimentos de coloração pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE). A técnica foi utilizada como controle histológico, bem como para observação do perfil morfológico geral dos membros anteriores e posteriores. Utilizou-se também a técnica de histoquímica específica para glicosaminoglicanos, portanto adequado para cartilagens, Azul de Alcian (pH = 2,5), para a observação do perfil morfológico e de prováveis alterações nos elementos cartilaginosos, que considerando a idade dos embriões (E6), apenas as regiões de zeugópode e autópole puderam ser dissecadas. No presente trabalho foram analisadas as estruturas do autópole, pois esta região na idade embrionária de estudo, apresenta intensa proliferação e diferenciação celulares.

### 3.4 MARCAÇÕES CELULARES POR IMUNO-HISTOQUÍMICA


Os cortes foram inicialmente desparafinizados em xilol e reidratados em série etanólica decrescente 100%-70%. A inativação das peroxidases endógenas foi realizada com solução de peróxido de hidrogênio: metanol (1:2) por 10 minutos, seguida de banho em tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) a

1M por 5 minutos e de dois banhos em PBS + Triton X-100 a 0,3% por 10 minutos cada banho, para permeabilização das membranas celulares. Posteriormente, os sítios inespecíficos foram inativados com solução de PBS + soro albumina bovina (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) a 5% por 30 minutos, seguido da incubação com anticorpo primário (Quadro 2) durante 12 horas a 4°C. Posteriormente, foram realizados três banhos com PBS + Triton X-100 a 0,3% por 10 minutos cada, seguidos da incubação com o anticorpo secundário (Quadro 3) por 3 horas a temperatura ambiente, e de três banhos com PBS por 20 minutos cada. Para as análises colorimétricas em microscopia de luz, os cortes foram tratados com solução de 3,3' diaminobenzidina (DAB) diluído em PBS + peróxido de hidrogênio a 10%. Para uma parte destes anticorpos foi utilizado o tratamento com extra-avidina por 45 minutos. As lâminas foram montadas com Entellan®. Para as análises em microscopia de fluorescência as lâminas foram montadas com Gelmount® ou com meio de montagem acrescido do marcador nuclear fluorescente DAPI (4'-6-Diamidino-2-fenilindol). Para os controles negativos da reação por imuno-histoquímica foi seguido os mesmos procedimentos com a omissão dos anticorpos primários, os quais foram substituídos por PBS a 1M.




Quadro 2: Anticorpos primários utilizados nas análises por imuno-histoquímica e citometria de fluxo.

ANTICORPO	ESPÉCIES		ISOTIPO	DILUIÇÃO	
	DESENVOLVIDA	ORIGEM		IMUNO	CITOMETRIA
Anti-Fosfohistona H3	Coelho	Humana	IgG	1:300	-
Anti-p21	Camundongo	Humana	IgG 1	1:100	1:1000
Anti-PCNA	Coelho	Humana	IgG	1:100	1:1000
Anti-p53	Coelho	Humana	IgG	1:100	1:1000
Anti-Bcl2	Camundongo	Humana	IgG 1	-	1:1000
Anti-Bak	Coelho	Humana	IgG	-	1:1000
Anti-VCAM-1	Camundongo	Humana	IgG 1	-	1:1000
Anti-Pax1	Cabra	Camundongo	IgG	1:100	1:1000
Anti-Pax9	Coelho	Humana	IgG	1:100	1:1000
Anti-Sox9	Camundongo	Humana	IgG 2a	1:100	1:1000

 Proteínas do ciclo celular

 Proliferação/ Apoptose

 Apoptose

 Proteínas específicas da diferenciação condrogênica

Quadro 3: Anticorpos secundários utilizados nas análises por imuno-histoquímica e citometria de fluxo.

ANTICORPO	ESPÉCIES DE ORIGEM	ISOTIPO
Anti-camundongo	Coelho	IgG
Anti-coelho	Cabra	IgG
Anti-camundongo	Cabra	IgG 2a
Anti-camundongo	Cabra	IgG 1
Anti-coelho	Cabra	IgG
Anti-camundongo Alexa-fluor 488	Cabra	IgG
Anti-camundongo Alexa-fluor 488	Cabra	IgG 1
Anti-cabra Alexa-fluor 488	Burro	IgG
Anti-coelho Alexa-fluor 568	Cabra	IgG
Anti-camundongo Alexa-fluor 633	Cabra	IgG
Anti-camundongo Alexa-fluor 633	Cabra	IgG 2a

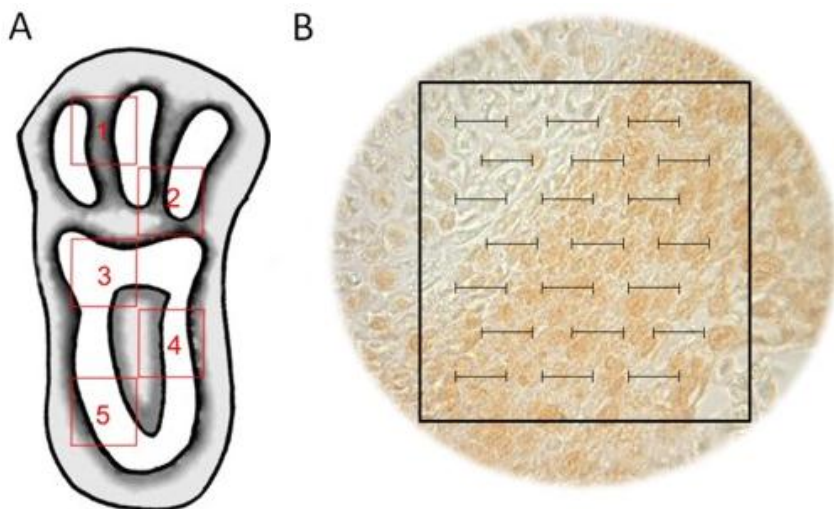
Conjugado a peroxidase

Conjugado a Biotina

Fluorescência

3.5 ANALISE QUANTITATIVA DAS MARCAÇÕES CELULARES

As células imunorreativas aos anticorpos utilizados para a detecção das proteínas relacionadas ao ciclo celular e de proteínas específicas da diferenciação condrogênica, foram quantificadas em microscopia de luz pelo método estereológico utilizando gráticula de Weibel (Figura 5) (Mandarim-de-Lacerda, 2003).



**Figura 5: Representação da metodologia empregada para a análise quantitativa das marcações celulares.** (A) Esquema do membro em desenvolvimento demonstrando com números o posicionamento dos campos alternados analisados no corte histológico. (B) Posicionamento da graticula de Weibel sobre o corte histológico. Fonte: o autor.

### 3.6 CITOMETRIA DE FLUXO

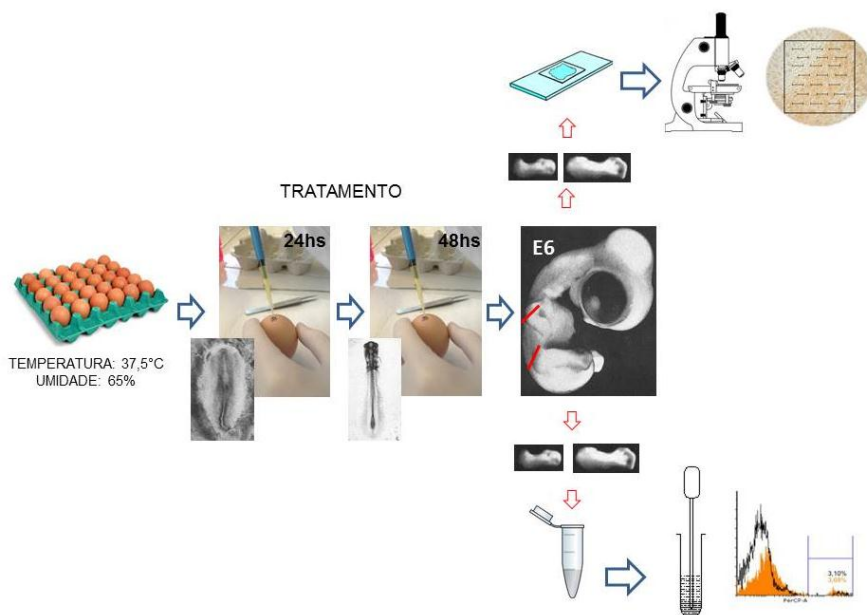
Para esta técnica membros anteriores e posteriores foram dissecados e divididos de acordo com os grupos experimentais, o grupo tratado com Hcy e o grupo controle. O tecido foi macerado e submetido a sete banhos consecutivos de PBS. Em seguida as células foram tripsinizadas durante o período de 30 minutos para facilitar a dissociação das células. Foram adicionados 100 $\mu$ L de BSA nas amostras, as quais permaneceram em agitação por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 640 X

g por 5 minutos, foi coletado o sobrenadante e ressuspendido em PBS/BSA 10%. As amostras foram divididas e incubadas com anticorpo primário (Quadro 2) durante 1 hora, seguidas da incubação com anticorpo secundário durante 40 minutos. As leituras foram feitas no citômetro de fluxo FACSCanto II e as análises dos dados, no programa Flowing Software 2.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos foram analisados no programa estatístico Statistica® versão 6.0 para Windows. Para verificar a existência de diferenças significativas entre os grupos, foi utilizado o teste de análise de variância de uma via (One-Way ANOVA),  $p \leq 0,05$ , seguido de teste post hoc de Tukey.

Abaixo, uma representação geral da metodologia de estudo e de análises, desde a obtenção dos ovos, os tratamentos realizados e as técnicas empregadas no presente trabalho.



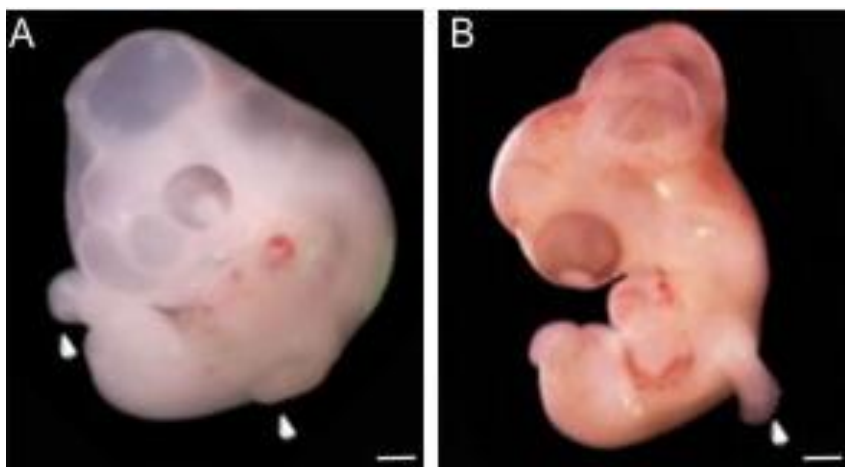
**Figura 6: Organograma da metodologia empregada.** Os ovos foram incubados em condições controladas de temperatura (37,5 °C) e umidade (65%) e divididos de acordo com os grupos experimentais. O tratamento foi realizado em duas partes (24hs e 48hs). Posteriormente, em E6 o embrião foi removido do ovo. Os membros foram dissecados e seguiram para as técnicas de histologia de rotina, histoquímica, imuno-histoquímica e citometria de fluxo.



## **4. RESULTADOS**

### **4.1 ANÁLISE DA MORFOLOGIA EXTERNA DOS MEMBROS**

Nos embriões analisados em E6 observou-se a ocorrência de anomalias congênitas nos membros relacionadas a alteração de posicionamento bilateral dos membros anteriores e posteriores (Figura 7) e a ausência bilateral de membros posteriores. As análises das frequências dessas alterações demonstraram que os embriões do grupo tratado com Hcy apresentaram uma frequência de 7% para as anomalias congênitas relacionadas a alterações de posicionamento bilateral de membros anteriores e posteriores. Enquanto que embriões tratados com Hcy+AF apresentaram uma frequência de 13% para alterações relacionadas à ausência bilateral de membros posteriores. Para os embriões dos grupos Controle e AF não houve registro de alterações morfológicas.

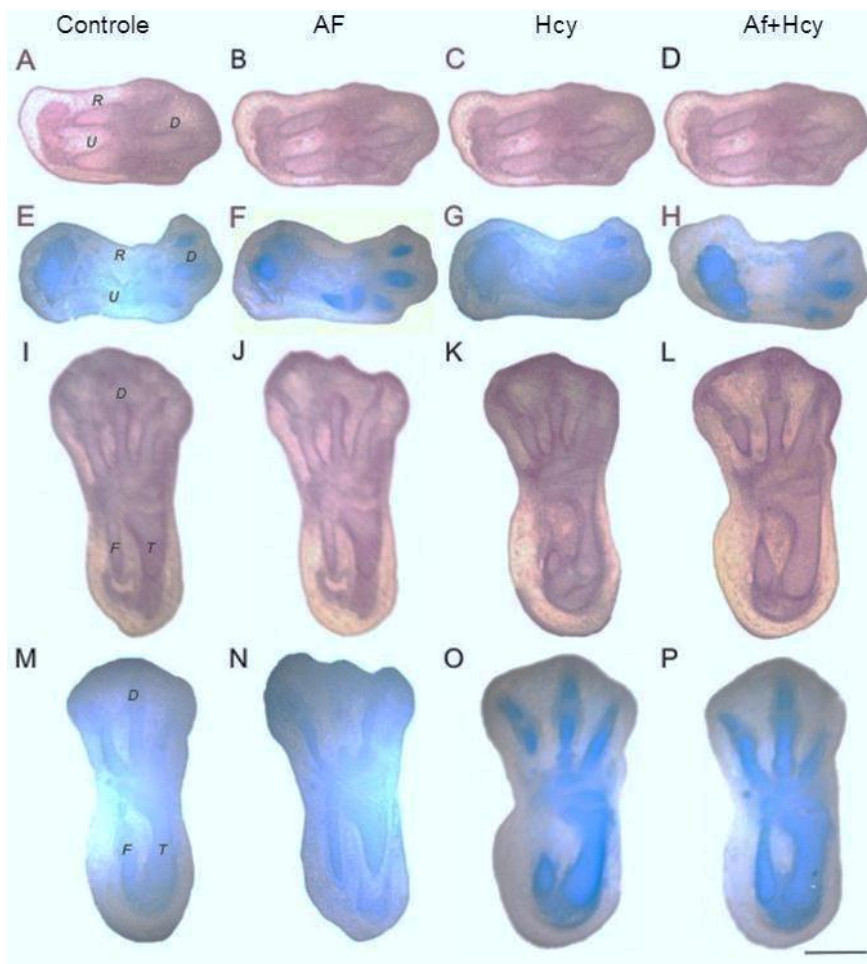


**Figura 7: Morfologia corporal dos embriões de *G. domesticus* em E6, destacando as anomalias dos membros anteriores.** (A) Morfologia normal dos membros anteriores e posteriores (setas brancas) de embrião do grupo controle. (B) Alterações de posicionamento do membro anterior (seta branca) em embrião tratado com Hcy. Barras: 1mm (n = 15 embriões).

#### 4.2 ANÁLISE MICRO-MORFOLÓGICA DOS MEMBROS

Para analisar a morfologia e a organização dos elementos cartilagenosos das regiões do zeugópode e do autópode dos membros de embriões de *G. domesticus*, foram realizadas análises histológicas por meio da coloração de HE e da técnica de histoquímica de Azul de Alcian (Figura 8). Não houve mudança na organização morfológica e dos elementos cartilagenosos dos membros anteriores e posteriores entre os embriões submetidos aos diferentes tratamentos.

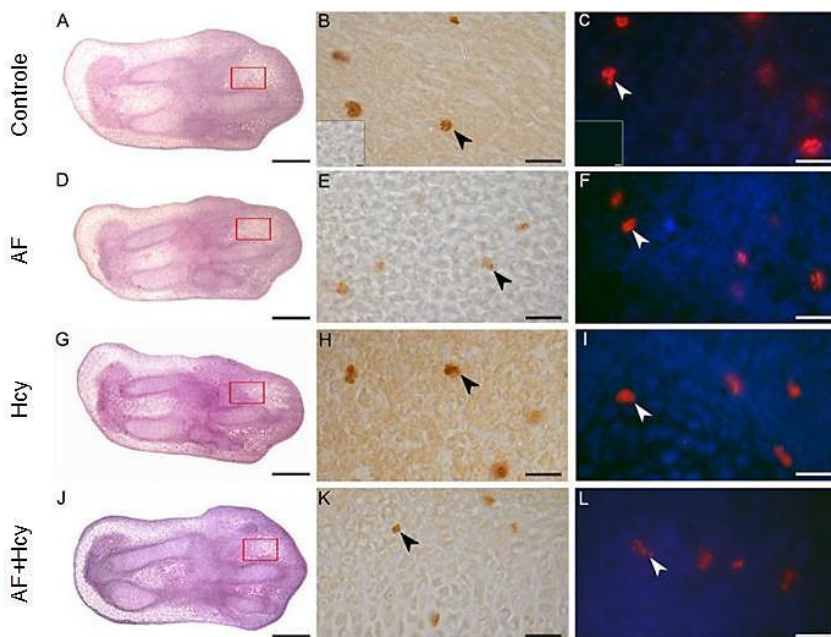




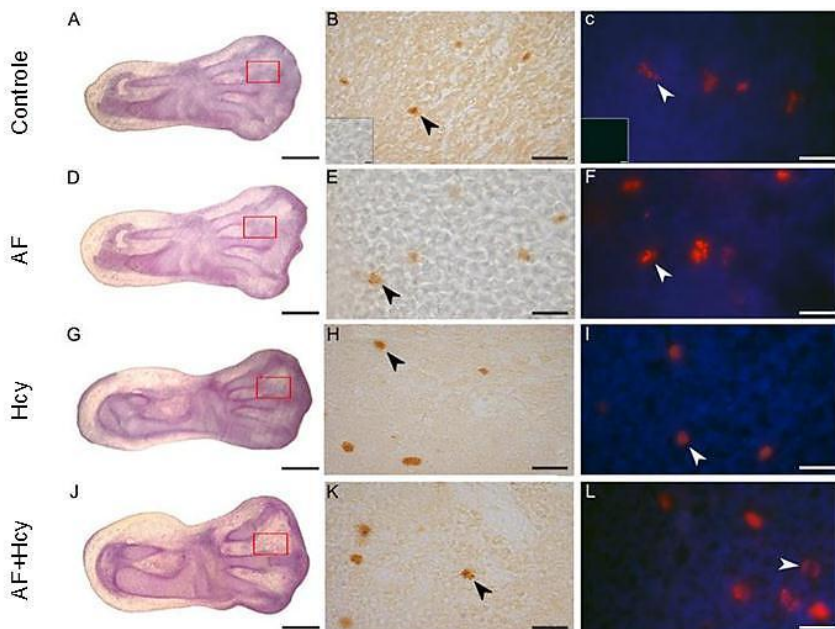
**Figura 8: Organização morfológica e dos elementos cartilaginosos dos membros anteriores e posteriores.** Secções coronais de membros anteriores (A-H) e posteriores (I-P) de *G. domesticus* evidenciando as regiões de condensação mesenquimal para originar o rádio (R), a ulna (U) e os dígitos (D) em membros anteriores e a tíbia (T), fíbula (F) e os dígitos (D) em membros posteriores. (A-D e I-L) Coloração com HE. (E-H e M-P) Condensações mesenquimais durante o processo de condrogênese evidenciada pela reação histoquímica com Azul de Alcian. Barra: 500  $\mu\text{m}$ .

### 4.3 ANÁLISES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Verificamos que houve marcação positiva para a proteína fosfohistona H3 (PHH3) nas regiões do zeugópode e do autópole (Figura 9 e Figura 10). As quantificações da expressão de PHH3, expressas pela densidade de células (NA) nos embriões submetidos aos quatro tratamentos foram:  $113,44 \text{ mm}^2 (\pm 7,20)$  para o grupo Controle;  $113,44 \text{ mm}^2 (\pm 7,20)$  para o grupo AF;  $107,26 \text{ mm}^2 (\pm 6,35)$  para o grupo Hcy e  $107,94 \text{ mm}^2 (\pm 7,26)$  para o grupo AF+Hcy. Para estas quantificações não houve diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p \geq 0,05$ ) (Figura 11A).



**Figura 9: Imunolocalização da proteína PHH3 em membros anteriores.** (ADGJ) Cortes coronais corados com HE evidenciando a região em que as células foram analisadas (retângulo vermelho). (BEHK) Imunomarcação em microscopia de luz (seta preta). (CFIL) Imunofluorescência (seta branca). Barras em A-J = 500µm e em B-L = 20µm. Incertos em B e C representam os controles negativos das técnicas de imuno-histoquímica e imunofluorescência. Barras = 20µm. (n = 5 embriões/grupo; 100 campos visuais/grupo).



**Figura 10: Imunolocalização da proteína PHH3 em membros posteriores.** (ADGJ) Cortes coronais corados em HE evidenciando a região em que as células foram observadas (retângulo vermelho). Barra: 500µm. (BEHK) Imunomarcção em microscopia de luz (seta preta). Barra: 20µm. (CFIL) Imunofluorescência (seta branca). Barras em A-J = 500µm e em B-L = 20µm. Incertos em B e C representam os controles negativos das técnicas de imuno-histoquímica e imunofluorescência. Barras = 20µm. (n = 5 embriões/grupo; 100 campos visuais/grupo).

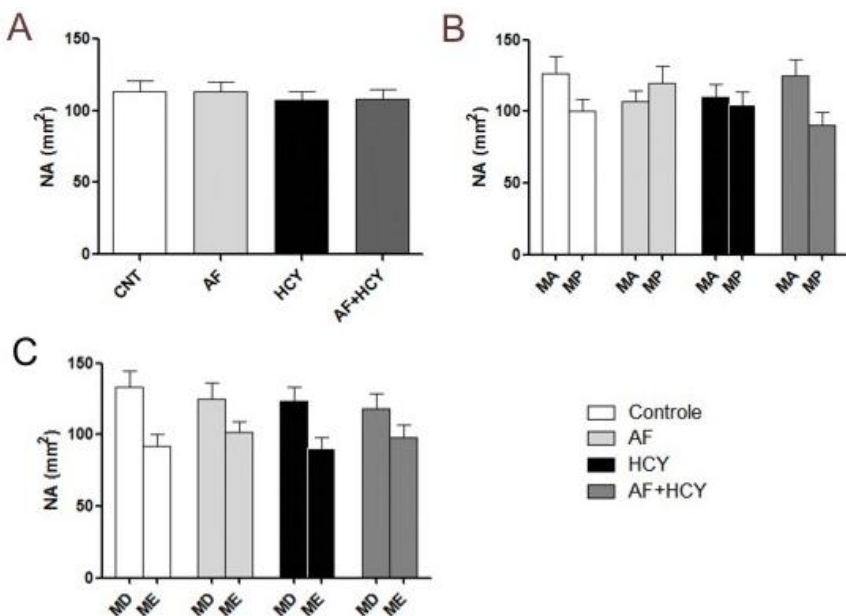
Também foram feitas comparações entre as quantificações da expressão de PHH3 entre os membros anteriores (MA) e posteriores (MP) (Tabela 1, Figura 11B) e membros do lado direito (MD) e esquerdo (ME) do corpo (Tabela 1; Figura 11C).

Tabela 1: Quantificações da imunolocalização da expressão da proteína PHH3.

	Controle	AF NA (mm <sup>2</sup> ) (± erro padrão)	Hcy	AF+Hcy
MA	126,51 (±11,84)	107,26 (± 7,39)	110,01 (± 9,00)	125,13 (± 11,23)
MP	100,38 (± 7,91)	119,63 (± 11,75)	104,51 (± 9,05)	90,75 (± 8,66)
MD	133,38 (±11,01)	125,13 (± 11,40)	123,76 (± 9,82)	118,26 (± 10,76)
ME	92,13 (± 8,47)	101,76(± 7,67)	90,75 (± 7,46)	97,63 (± 9,64)

MA: Membros Anteriores      MP: Membros Posteriores      MD: membros anteriores e posteriores lado direito      ME: membros anteriores e posteriores lado esquerdo  
 NA: Densidade numérica de células por área      AF: Ácido Fólico      Hcy: D,L-homocisteína

Não houve diferenças significativas entre a expressão de PHH3 quanto à bilateralidade e o posicionamento de brotos de membros anteriores e posteriores em embriões de *G. domesticus*, por isso para as demais proteínas analisadas não foram adotados estas análises comparativas. Ou seja, os resultados mostrados a seguir referem-se aos membros anteriores e membros posteriores nas 4 condições experimentais propostas.



**Figura 11: Densidade numérica por área (NA) das células reativas para fosfohistona H3 (PHH3).** (A) Quantificação total dos quatro grupos de estudo. (B) Quantificação comparativa entre membros anteriores (MA) e membros posteriores (MP). (C) Quantificação comparativa bilateral: membros do lado direito (MD) e membros do lado esquerdo (ME). Barras representam a média ( $\bar{x}$ )  $\pm$  erro padrão. (n = 5 embriões/grupo; 100 campos/grupo).

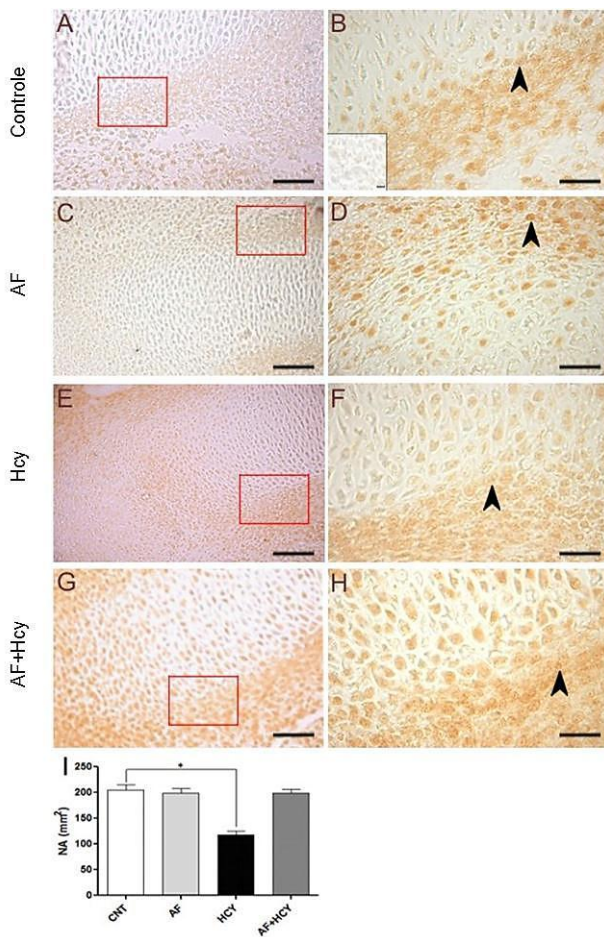
Foram quantificadas as proteínas p21, PCNA e p53 envolvidas no ciclo celular. Para isto, quantificou-se o NA das células mesenquimais marcadas com os anticorpos anti-p21, anti-PCNA e anti-p53 nas regiões mais condensadas que circundam o molde cartilaginoso das futuras regiões dos dígitos (autópode).

As quantificações de células imunorreativas para a proteína p21 (Figura 12) nos embriões dos grupos Controle, AF e AF+Hcy

foram  $204,89 \text{ mm}^2 (\pm 9,82)$ ,  $198,70 \text{ mm}^2 (\pm 8,62)$  e  $198,70 (\pm 7,62)$ , respectivamente. Nos embriões tratados com Hcy observou-se uma redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) na expressão de p21, cujo NA foi de  $118,94 \text{ mm}^2 (\pm 7,10)$ .

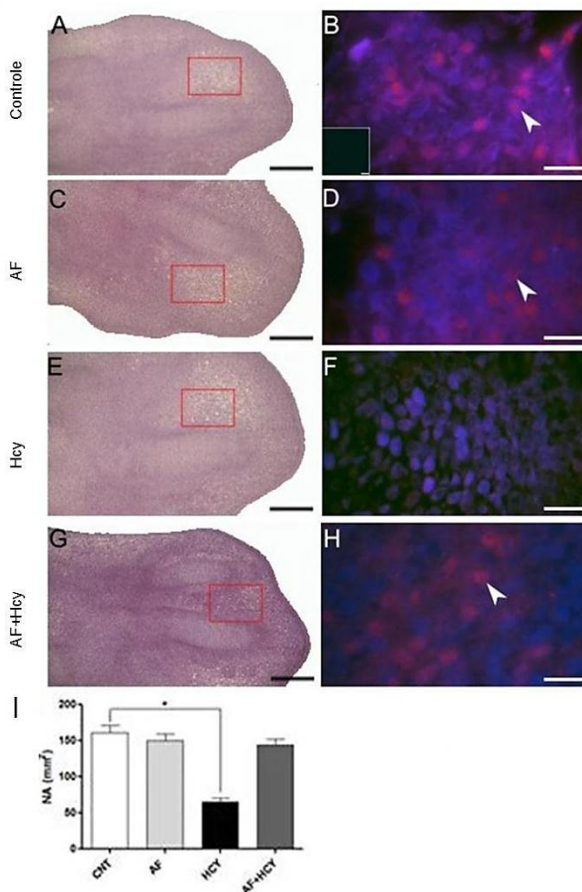
Nos embriões tratados com Hcy, verificou-se a redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) na expressão de PCNA (Figura 13), avaliada pela densidade de células positivas NA, que foi de  $65,31 \text{ mm}^2 (\pm 5,56)$ , quando comparada à expressão nos embriões do grupo controle de  $161,57 \text{ mm}^2 (\pm 9,79)$ , grupo AF de  $149,89 \text{ mm}^2 (\pm 9,59)$  e grupo AF+Hcy de  $143,70 \text{ mm}^2 (\pm 8,06)$ .

Embriões tratados com Hcy apresentaram um aumento significativo da expressão da proteína p53 (Figura 14), cujo NA foi de  $119,63 \text{ mm}^2 (\pm 5,40)$  ( $p \leq 0,05$ ), quando comparados aos embriões dos grupos Controle ( $96,94 \text{ mm}^2 \pm 3,66$ ), AF ( $94,19 \text{ mm}^2 \pm 3,74$ ) e AF+Hcy ( $98,32 \text{ mm}^2 \pm 4,17$ ).

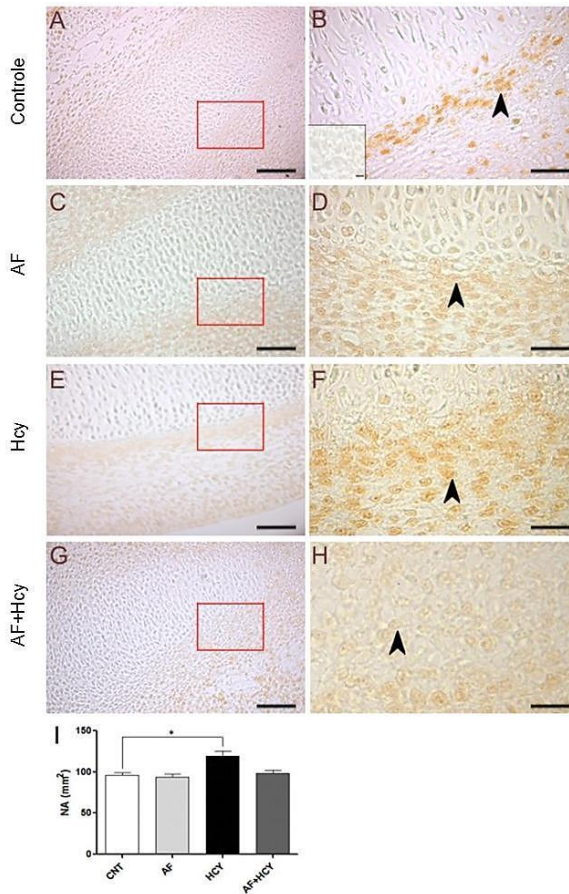


**Figura 12: Imunomarcção utilizando o anticorpo anti-p21.** (A-G) Vista panorâmica evidenciando as células mesenquimais em torno do molde cartilaginoso do autópode. (B-H) Imagens ampliadas da região demarcada (retângulos vermelhos) evidenciando os núcleos marcados (setas pretas). Inserto em B representa o controle negativo da técnica de imunohistoquímica. (I) Gráfico das quantificações de células imunorreativas. Barras representam a média ( $\bar{x}$ )  $\pm$  erro padrão. Diferenças significativas em relação ao controle (\*)  $p \leq 0,05$ . Barras em A-G = 50 $\mu$ m e em B-H e inserto = 20 $\mu$ m. (n = 5 embriões/grupo; 100 campos visuais/grupo).





**Figura 13: Imunolocalização da proteína PCNA.** (A-G) Cortes coronais corados com HE evidenciando a região das células mesenquimais entre o molde cartilaginoso na região do autópode (retângulo vermelho). (B-H) Imunofluorescência. Inserto em B representa o controle negativo da técnica de imuno-histoquímica. (I) Gráfico das quantificações de células imunorreativas. Barras representando a média ( $\bar{x}$ )  $\pm$  erro padrão. Diferenças significativas em relação ao controle (\*)  $p \leq 0,05$ . Barras A-G = 200 $\mu$ m e em B-H e inserto = 20 $\mu$ m. (n = 5 embriões/grupo; 100 campos visuais/grupo).



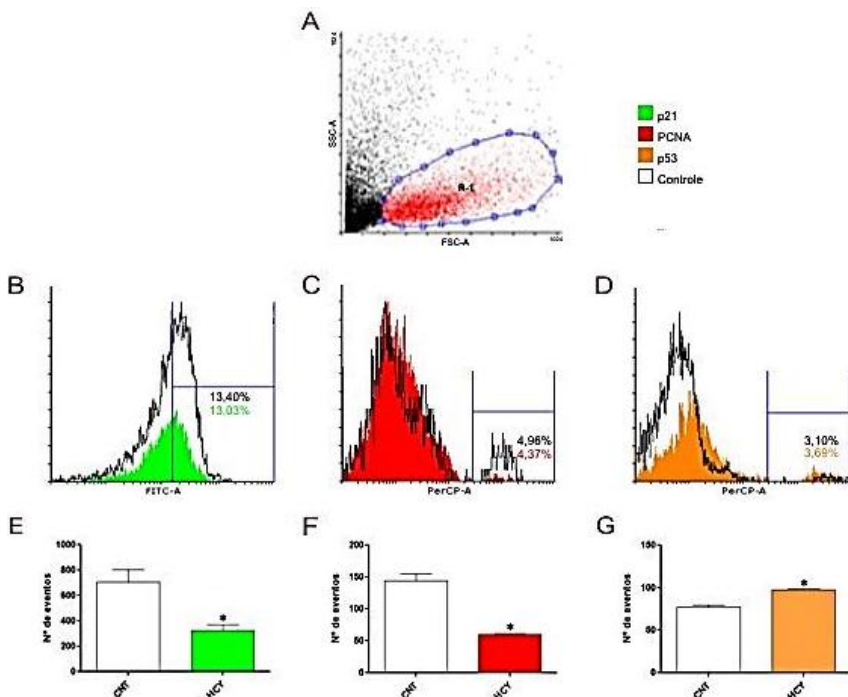
**Figura 14: Imunomarcção utilizando o anticorpo anti-p53.** (A-G) Vista panorâmica evidenciando as células mesenquimais em torno do molde cartilaginoso do autópode. (B-H) Imagens ampliadas da região demarcada (retângulos vermelhos) evidenciando os núcleos marcados (setas pretas). Inserto em B representa o controle negativo da técnica de imunohistoquímica. (I) Gráfico das quantificações de células imunorreativas. Barras representam a média ( $\bar{x}$ )  $\pm$  erro padrão. Diferenças significativas em relação ao controle (\*)  $p \leq 0,05$ . Barras em A-G = 50 $\mu$ m e em B-H e inserto = 20 $\mu$ m. (n = 5 embriões/grupo; 100 campos visuais/grupo).

As proteínas p21, PCNA e p53 foram também quantificadas por citometria de fluxo. A expressão da proteína p21 apresentou-se significativamente menor ( $p \leq 0,05$ ) nos embriões tratados com Hcy, sendo quantificadas 327,67 células reativas ( $\pm 43,73$ ) (13,03%) ( $p \leq 0,05$ ), quando comparada aos embriões do grupo Controle, cuja quantidade de células reativas foi de 707,00 eventos ( $\pm 96,50$ ) (13,40%) ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 15 B e E).

As quantificações para PCNA foram significativamente maiores ( $p \leq 0,05$ ) nos embriões do grupo Controle com 144,00 células reativas ( $\pm 11,60$ ) (4,96%) ( $p \leq 0,05$ ) em comparação com os embriões tratados com Hcy onde foram quantificadas 59,67 células ( $\pm 2,73$ ) (4,37%) (Figura 15 C e F).

Para a proteína p53, nos embriões do grupo Hcy foram quantificadas 97,67 células reativas ( $\pm 1,37$ ) (3,69%) ( $p \leq 0,05$ ), sendo significativamente maior do que nos embriões do grupo Controle, onde a quantificação das células reativas foi de 77,67 ( $\pm 1,87$ ) (3,10%) ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 15 D e G).

De um modo geral, os dados de quantificação das proteínas p21, PCNA e p53 demonstram uma redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) na expressão das proteínas p21 e PCNA e um aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) na expressão da proteína p53 quando comparados os embriões dos grupos Controle e Hcy.



**Figura 15: Quantificação das proteínas do ciclo celular p21, PCNA e p53 por citometria de fluxo.** (A) Dot plot (Tamanho (X) – do inglês *FSC-A* - *Forward Scatter* / Complexidade (Y) – do inglês *Side scatter*) demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células mesenquimais analisadas (R-1 – vermelho). Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas (entre as barras) (B, C e D). Gráficos de barras representando a média ( $\bar{x}$ )  $\pm$  erro padrão do número de eventos marcados. Diferenças significativas representadas em relação ao grupo Controle (\*)  $p \leq 0,05$  (E, F e G). Análises realizadas em triplicatas.  $n = 16$  embriões/análise/grupo.

#### 4.4 ANÁLISES DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR

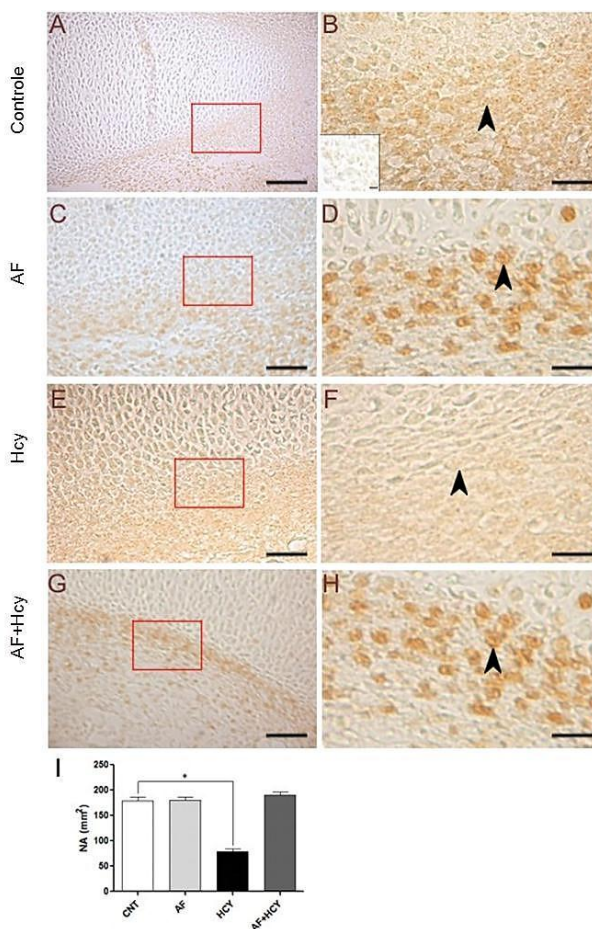
Foram realizadas marcações por imuno-histoquímica para o reconhecimento da expressão dos produtos dos genes *Pax1*, *Pax9* e *Sox9* durante a diferenciação das células mesenquimais em matriz cartilaginosa. Para isto, quantificou-se o NA destas células mesenquimais marcadas com os anticorpos anti-Pax1, anti-Pax9 e anti-Sox9 nas regiões mais condensadas que circundam o molde cartilaginoso das futuras regiões dos dígitos (autópode).

As células imunorreativas para o anticorpo anti-Pax1 (Figura 16) revelaram uma redução significativa da expressão da proteína Pax1 nos embriões tratados com Hcy, cujo NA foi de  $79,07 \text{ mm}^2 (\pm 5,47)$  ( $p \leq 0,05$ ), quando comparado ao NA do grupo Controle de  $179,45 \text{ mm}^2 (\pm 6,47)$ , do grupo AF de  $180,14 \text{ mm}^2 (\pm 7,86)$  e do grupo AF+Hcy:  $190,45 \text{ mm}^2 (\pm 6,24)$  ( $p \leq 0,05$ ).

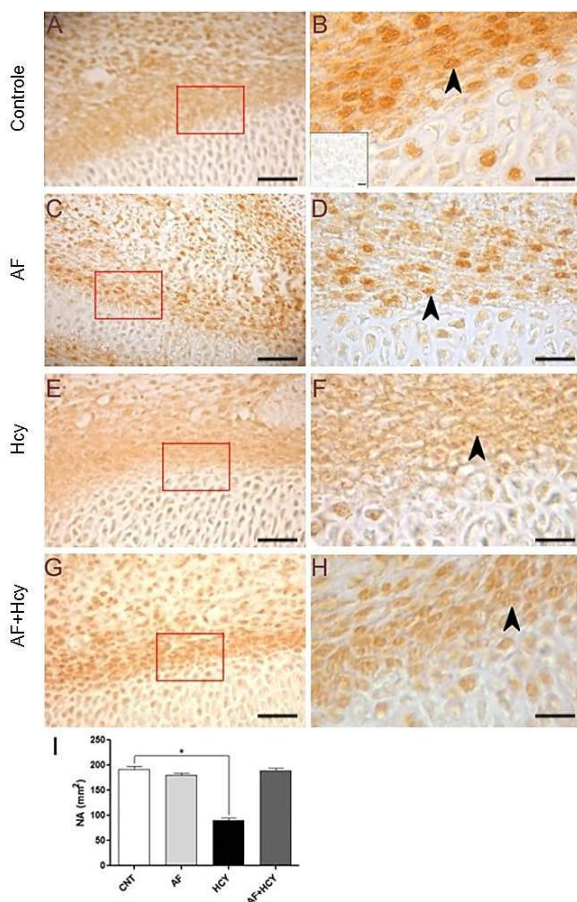
As quantificações das células reativas ao anticorpo anti-Pax9 (Figura 17) foram maiores nos embriões dos grupos Controle, AF e AF+Hcy, cujo NA de células positivas foi de  $191,83 \text{ mm}^2 (\pm 5,46)$ ,  $180,14 \text{ mm}^2 (\pm 4,34)$  e  $188,39 \text{ mm}^2 (\pm 5,04)$ , respectivamente ( $p \leq 0,05$ ). Já os embriões tratados com Hcy apresentaram uma redução significativa no NA das células reativas ao anticorpo anti-Pax9 ( $90,07 \text{ mm}^2 \pm 5,23$ ) ( $p \leq 0,05$ ).

As marcações com anticorpo anti-Sox9 (Figura 18) indicaram uma redução significativa na expressão de Sox9 nos embriões tratados com Hcy, cujo NA foi de  $86,63 \text{ mm}^2 (\pm 4,54)$  ( $p \leq$

0,05). Enquanto que nos embriões dos demais grupos as quantificações foram maiores, sendo o NA de 157,45 mm<sup>2</sup> ( $\pm$  4,71) para o grupo controle; de 162,95 mm<sup>2</sup> ( $\pm$  5,32) para o grupo AF e de 152,64 mm<sup>2</sup> ( $\pm$  4,43) ( $p \leq 0,05$ ) no grupo AF+Hcy.

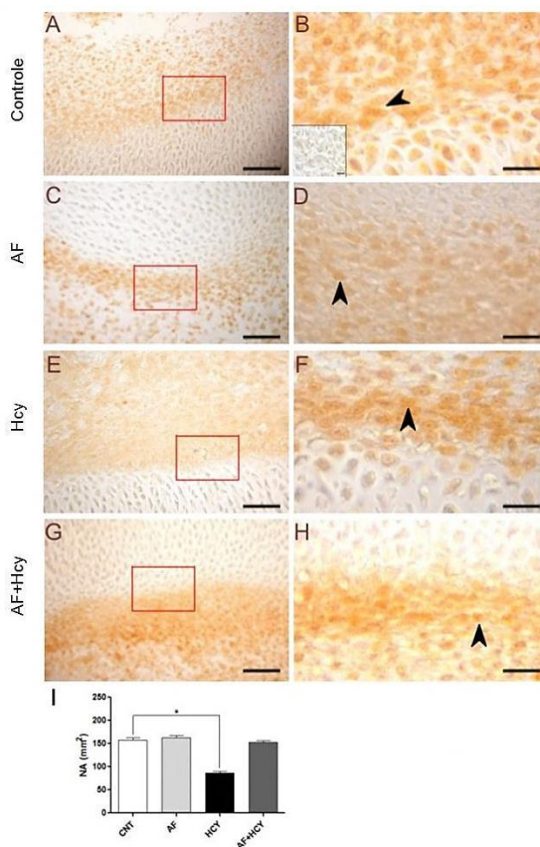


**Figura 16: Imunomarcção utilizando o anticorpo anti-Pax1.** A-G) Vista panorâmica evidenciando as células mesenquimais em torno do molde cartilaginoso do autópode. (B-H) Imagens ampliadas da região demarcada (retângulos vermelhos) evidenciando os núcleos marcados (setas pretas). Inserto em B representa o controle negativo da técnica de imunohistoquímica. (I) Gráfico das quantificações de células imunorreativas. Barras representam a média ( $\bar{x}$ )  $\pm$  erro padrão. Diferenças significativas em relação ao controle (\*)  $p \leq 0,05$ . Barras em A-G = 50 $\mu$ m e em B-H e inserto = 20 $\mu$ m. (n = 5 embriões/grupo; 100 campos visuais/grupo).



**Figura 17: Imunolocalização utilizando o anticorpo anti-Pax9.** A-G) Vista panorâmica evidenciando as células mesenquimais em torno do molde cartilaginoso do autópode. (B-H) Imagens ampliadas da região demarcada (retângulos vermelhos) evidenciando os núcleos marcados (setas pretas). Inserto em B representa o controle negativo da técnica de imuno-histoquímica. (I) Gráfico das quantificações de células imunorreativas. Barras representam a média ( $\bar{x}$ )  $\pm$  erro padrão. Diferenças significativas em relação ao controle (\*)  $p \leq 0,05$ . Barras em A-G = 50 $\mu$ m e em B-H e inserto = 20 $\mu$ m. (n = 5 embriões/grupo; 100 campos visuais/grupo).





**Figura 18: Imunomarcção utilizando o anticorpo anti-Sox9.** (A-G) Imagem panorâmica evidenciando as células mesenquimais em torno do molde cartilaginoso da região do autópode (retângulo vermelho). (B-H) Imagem ampliada da região demarcada evidenciando os núcleos marcados (setas pretas). (I) Gráfico das quantificações de células imunorreativas para Pax1. Barras representando a média ( $\bar{x}$ )  $\pm$  erro padrão. Diferenças significativas representadas somente em relação ao controle (\*)  $p \leq 0,05$ . Barras em A-G = 50 $\mu$ m e em B-H = 20 $\mu$ m. Incerto em B representa o controle negativo da técnica de imuno-histoquímica. Barra = 20 $\mu$ m (n = 5 embriões/grupo; 100 campos visuais/grupo).

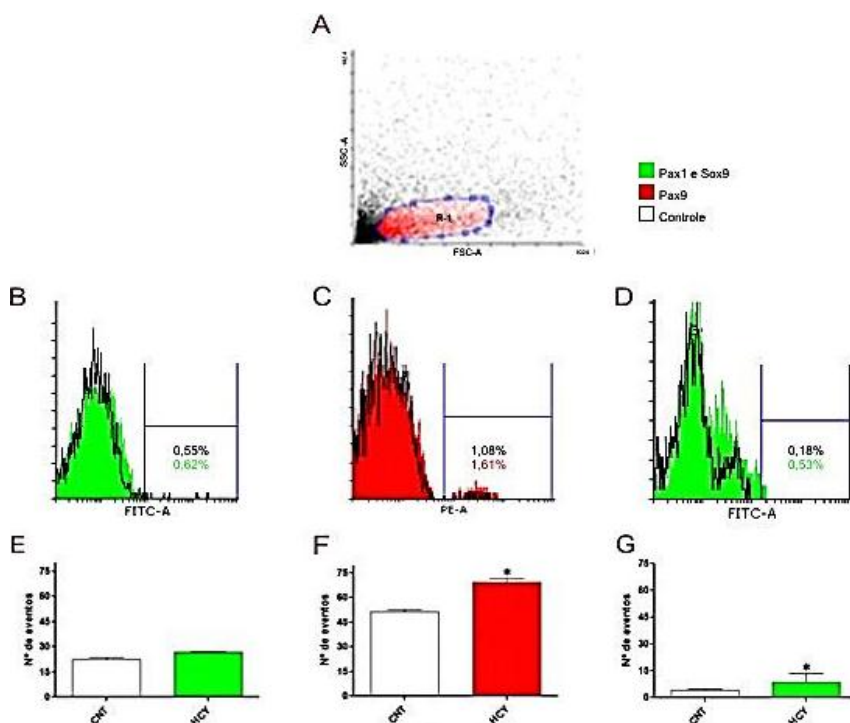
Os produtos gênicos de *Pax1*, *Pax9*, e *Sox9*, essenciais para o processo de diferenciação celular das células mesenquimais em matriz cartilaginosa, foram também quantificados por análises de citometria de fluxo.

As marcações para o produto gênico de *Pax1* não revelaram diferenças significativas entre os embriões tratados com Hcy, sendo quantificados 26,67 células reativas ( $\pm 0,40$ ) (0,62%) ( $p \leq 0,05$ ) e os embriões do grupo Controle, nos quais foram quantificadas 22,66 células reativas ( $\pm 1,04$ ) (0,55%) ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 19B e E).

Nas quantificações para os produtos gênicos de *Pax9* nos embriões do grupo Hcy registraram-se 69,33 células reativas ( $\pm 2,14$ ) (1,61%) ( $p \leq 0,05$ ). Havendo uma redução significativa nos embriões do grupo Controle nas quais foram quantificadas 51,33 células reativas ( $\pm 0,96$ ) (1,08%) ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 19C e F).

Os produtos gênicos de *Sox9* apresentaram 8,67 eventos ( $\pm 0,46$ ) (0,53%) ( $p \leq 0,05$ ) para os embriões do grupo Hcy, o que foi significativamente maior do que nos embriões do grupo Controle, nos quais foram quantificadas 4,00 células reativas ( $\pm 0,08$ ) (0,18%) ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 19D e G).

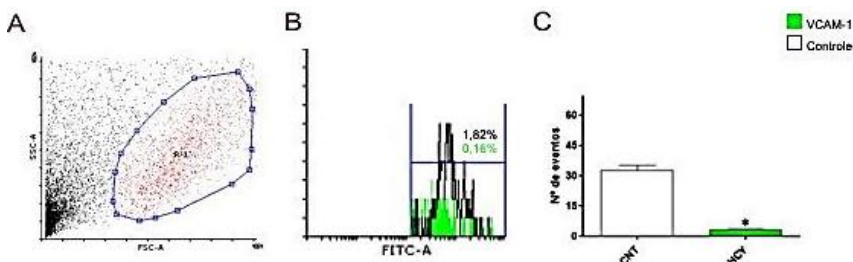
Diferentemente da imuno-histoquímica, os dados das quantificações obtidas por citometria de fluxo indicam um aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) na expressão dos produtos gênicos de *Pax1*, *Pax9*, e *Sox9* quando comparados os embriões dos grupos Controle e Hcy.



**Figura 19: Quantificação dos produtos gênicos de Pax1, Pax9, e Sox9 por citometria de fluxo.** A) Dot plot (Tamanho (X) – do inglês *FSC-A* - *Forward Scatter* / Complexidade (Y) – do inglês *Side scatter*) demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células mesenquimais analisadas (R-1 – vermelho). Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas (entre as barras) (B, C e D). Gráficos de barras representando a média ( $\bar{x}$ )  $\pm$  erro padrão do número de eventos marcados. Diferenças significativas representadas em relação ao grupo Controle (\*)  $p \leq 0,05$  para Pax9 e Sox9 (E, F e G). Análises realizadas em triplicata.  $n = 16$  embriões/análise/grupo.

#### 4.4.1 Detecção/quantificação das Moléculas de Adesão VCAM-1

A detecção/quantificação da molécula de adesão VCAM-1 foi realizada somente por citometria de fluxo. As quantificações foram significativamente menores nos embriões tratados com Hcy: 3,00 células reativas ( $\pm 0,08$ ) (1,82%) ( $p \leq 0,05$ ), quando comparadas aos embriões do grupo Controle, onde foram quantificadas 32,66 células reativas ( $\pm 0,24$ ) (0,16%) ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 20B e C).

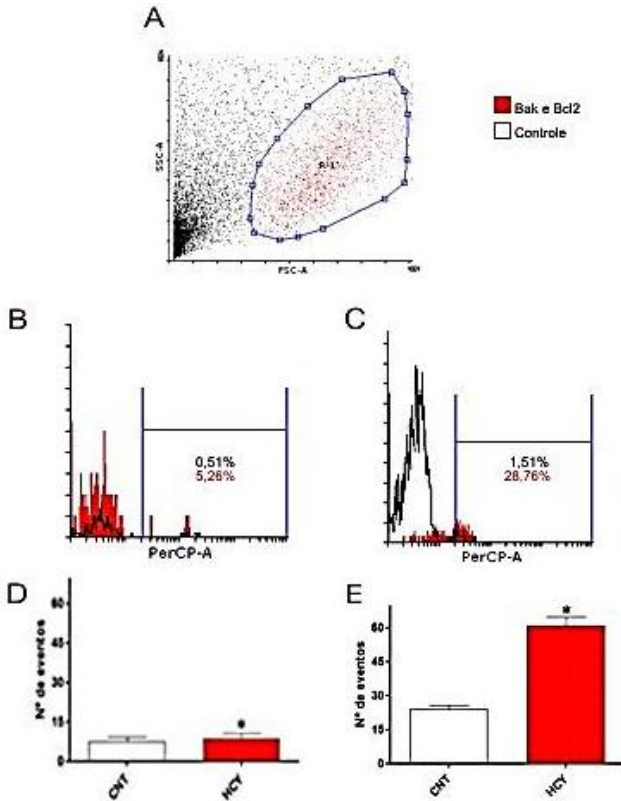


**Figura 20: Quantificação da expressão de VCAM-1 por citometria de fluxo.** (A) Dot plot (Tamanho (X) – do inglês *FSC-A - Forward Scatter* / Complexidade (Y) – do inglês *Side scatter*) demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células mesenquimais analisadas (R-1 – vermelho). Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas (entre as barras) (B). Gráfico de barras representando a média ( $\bar{x}$ )  $\pm$  erro padrão do número de eventos marcados. Diferença significativa representada em relação ao grupo Controle (\*)  $p \leq 0,05$  (C). Análises realizadas em triplicata sendo utilizado um  $n=16$  embriões/análise/grupo.

## 4.5 ANÁLISES DE APOPTOSE

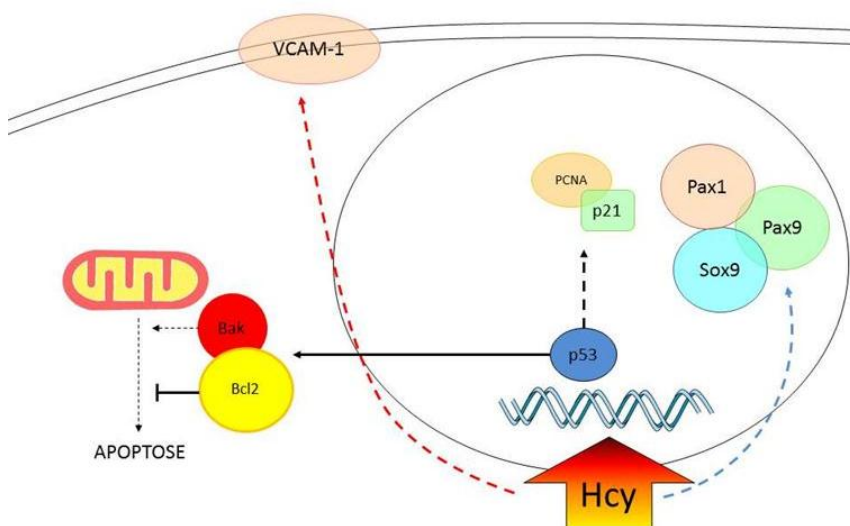
### 4.5.1 Detecção/quantificação das proteínas Bak e Bcl2

Na detecção/quantificação das proteínas envolvidas no processo de apoptose a expressão da proteína pró-apoptótica Bak mostrou-se maior nos embriões do grupo Hcy, sendo quantificadas 8,67 células reativas ( $\pm 0,20$ ) (5,26%) ( $p \leq 0,05$ ) de modo que nos embriões do grupo Controle foram quantificadas 7,67 células reativas ( $\pm 0,16$ ) (0,51%) ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 21B e D). Já a expressão da proteína antiapoptótica Bcl2 mostrou-se significativamente menor nos embriões do grupo Controle, que apresentou 24,00 células imunorreativas ( $\pm 1,69$ ) (1,51%) ( $p \leq 0,05$ ), quando comparadas aos embriões do grupo Hcy, com 61,00 ( $\pm 4,07$ ) de células imunorreativas (28,76%) ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 21C e E).



**Figura 21: Quantificação da expressão das proteínas Bak e Bcl2 por citometria de fluxo.** (A) Dot plot (Tamanho (X) – do inglês FSC-A - Forward Scatter / Complexidade (Y) – do inglês Side scatter) demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células mesenquimais analisadas (R-1 – vermelho). Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas (entre as barras) (B e C). Gráficos de barras representando a média ( $\bar{x}$ )  $\pm$  erro padrão do número de eventos marcados. Diferença significativa representada em relação ao grupo Controle (\*)  $p \leq 0,05$  (D e E). Análises realizadas em triplicata sendo utilizado um  $n=16$  embriões/análise/grupo.

Em síntese, os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que elevados níveis de Hcy interferem aumentando a expressão da proteína p53 e diminuindo a expressão das proteínas p21 e PCNA envolvidas no ciclo celular. Além disso, pode diminuir a expressão dos produtos gênicos de *Pax1*, *Pax9* e *Sox9* e das moléculas de adesão VCAM-1 na diferenciação condrogênica (Figura 22, Tabela 2).



**Figura 22: Esquema das interferências induzidas por elevados níveis de Hcy na expressão de proteínas do ciclo celular e da diferenciação condrogênica.** Aumento na expressão de p53 que promove o aumento da expressão de Bak (pró-apoptótica) e Bcl2 (antiapoptótica) (seta contínua preta). Redução na expressão das proteínas do ciclo celular p21 e PCNA (seta pontilhada preta). Redução na expressão das proteínas de diferenciação condrogênica Pax1, Pax9 Sox9 (seta pontilhada azul) e redução na expressão da molécula de adesão VCAM-1 (seta pontilhada vermelha).

Tabela 2: Interferência de elevados níveis de Hcy na expressão de proteínas do ciclo celular e da diferenciação condrogênica

GRUPOS	p21	PCNA	p53	Bak	Bcl2	VCAM-1	Pax1	Pax9	Sox9
AF	Não houve alteração na expressão								
Hcy	--	--	+	+	++	--	--	--	--
AF+Hcy	Não houve alteração na expressão								

Valores de referência com relação ao grupo Controle -- Diminuição expressiva + Aumento  
++ Aumento expressivo AF: Ácido Fólico Hcy: D,L-homocisteína



## 5. DISCUSSÃO

O interesse por estudar como a Hcy interfere no desenvolvimento dos membros promovendo o aparecimento de anomalias congênitas foi despertado inicialmente pelo estudo de Shaw et al., 1995. Este estudo demonstrou que elevados níveis de Hcy no sangue das mães estavam relacionados ao nascimento de neonatos com anomalias nos membros, numa frequência de 76,2%. Mais recentemente, van Mil et al. (2010) relataram o aparecimento de anomalias dos membros cuja frequência variou de 43% a 52%. Curiosamente, essa frequência é maior que as frequências de DTN, os quais são bem estudados e classicamente relacionados às condições de hiperhomocisteinemia.

Elevados níveis plasmáticos de Hcy estão relacionados com a deficiência materna de AF. Vários estudos de caso-controle populacional têm demonstrado que a suplementação periconcepcional multivitamínica com AF (0,4-5 mg/dia) está associada à uma diminuição do risco de anomalias congênitas (Huhta e Hernandez-Robles, 2005; Blom, 2009). Essa relação é explicada bioquimicamente pela ação da enzima metionina sintetase que é dependente de AF (Li et al., 2009).

Em humanos, a prevalência de anomalias congênitas em membros é de seis a cada 10.000 nascidos vivos, e destas anomalias, a incidência é maior nos membros anteriores em comparação aos membros posteriores. Assim como anomalias

unilaterais são mais frequentes do que anomalias bilaterais, acometendo principalmente os membros do lado direito (Ermito et al., 2009).

Contrariamente, nossos resultados demonstram a ocorrência de anomalias congênitas relacionadas ao mau posicionamento bilateral dos membros anteriores e posteriores e a ausência bilateral de membros posteriores nos embriões de *G. domesticus* analisados em E6 do grupo tratado com Hcy (7%) e do grupo tratado com AF+Hcy (13%). O que sugere que o aparecimento destas anomalias está associado à exposição a elevados níveis de Hcy, uma vez que para os nascidos vivos considera-se que a frequência normal de malformações pode variar de 2-3%, sendo associada, entre outros fatores, à influência de agentes teratogênicos (Stevenson, 1993).

A etiologia destas anomalias congênitas, a influência morfogenética e a forma como os micronutrientes estão envolvidos nestes processos são em grande parte desconhecidos. Para explicar as causas do aparecimento destas anomalias, este estudo foi dirigido com a finalidade de investigar o efeito de elevados níveis de Hcy no processo de formação dos elementos cartilaginosos durante o desenvolvimento dos membros anteriores e posteriores em embriões de *G. domesticus*.

*G. domesticus* é um excelente modelo para estudar desenvolvimento dos membros em tetrápodes, principalmente por causa da facilidade de manipulação e por permitir o acompanhamento dos eventos do desenvolvimento. Além disso, os

princípios que fundamentam o desenvolvimento dos membros em embriões de galinha podem ser aplicáveis a outros tetrápodes, inclusive humanos. Outro fator preponderante é que as sequências gênicas de *G. domesticus* são todas conhecidas, o que gera novas oportunidades de observação e manipulação dos membros nestes embriões (Tickle, 2004). As alterações na organização morfológica decorrentes de alterações na expressão gênica são facilmente reproduzíveis em embriões de galinha, porque os genes envolvidos na padronização dos membros são altamente conservados ao longo da escala animal (Hinchliffe, 2002).

Considerando o uso de *G. domesticus* como modelo experimental, este estudo baseou-se em análises de diferenciação condrogênica, durante o processo de ossificação endocondral, e na expressão das proteínas relacionadas ao ciclo celular, para verificar o potencial que elevados níveis de Hcy tem em comprometer o crescimento ósseo em decorrência de alterações na proliferação e diferenciação celular.

O desequilíbrio na expressão de proteínas do ciclo celular pode estar relacionado ao mecanismo epigenético de metilação do DNA que ocorre em sítios citosinas CpG (citosina-guanina), para estabelecer e manter padrões de expressão gênica tecido-específicos durante a embriogênese. Os grupos metil transferidos nas reações de metilação do DNA são gerados a partir do metabolismo da Hcy (Reik et al., 2001; Dean et al., 2005; Waterland, 2006). Deficiências de AF podem levar a danos no DNA, alterando a

metilação da molécula de DNA e aumentando o nível de Hcy (Fenech et al., 1998). Neste caso, AF é necessário para a síntese de metionina e S-adenosilmetionina, comum doador de grupamentos metil para a manutenção de padrões de metilação do DNA determinando a expressão gênica (Blount et al., 1997; Zingg e Jones, 1997; Lin et al., 2007).

Observa-se que em condições de hiperhomocisteinemia, danos ao DNA são induzidos pela não-remetilação de Hcy a metionina, e que essas situações afetam diretamente a expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular, bem como as proteínas envolvidas na diferenciação e na apoptose (Oikawa et al., 2003; Ivanov et al., 2007).

Ciclos contínuos de replicação do DNA são constantes durante o desenvolvimento dos membros, por esse motivo qualquer falha ou mudança no processo de metilação, se não corrigidas, podem ser mantidas durante o desenvolvimento (Braithwaite et al., 2006).

Os dados obtidos a partir de análises por imuno-histoquímica combinados a análises por citometria de fluxo demonstram que nas células mesenquimais, as proteínas envolvidas no ciclo celular - p21 e PCNA - têm uma redução significativa na expressão no grupo tratado com Hcy, enquanto que neste mesmo grupo a proteína p53 tem sua expressão aumentada. No grupo tratado com AF e AF+Hcy observou-se o efeito protetor impedindo que a expressão destas proteínas fosse alterada.

A proteína p53 regula a resposta das células ao dano do DNA, exercendo sua função de induzir proteínas específicas do ciclo celular, como a p21 e PCNA, que promovem a parada do ciclo, ou ainda proteínas pró-apoptóticas, como a Bak, que induz a liberação do citocromo c (Ivanov et al., 2007). As situações de aumento de p53 sugerem um papel para esta proteína na inibição da síntese de DNA, que é uma resposta fisiológica ativa ao dano ao DNA. A relação entre p53 e os níveis de p21 no núcleo podem ser aumentados em situações de dano ao DNA. Do contrário, na ausência, diminuição ou aumento da expressão de p21 pode desencadear uma resposta anormal do ciclo celular levando a célula à apoptose (Kastan et al., 1991).

O aumento da expressão de p53 estimula a expressão dos genes que codificam as proteínas p21 e PCNA, o que leva a uma inibição da atividade das ciclinas dependentes de cinases (Cdk's), observada na fase G1, havendo um declínio gradual quando há a progressão para fase S. Deste modo, p21 e PCNA desempenham um papel central na resposta celular ao dano ao DNA, inibindo o início da replicação do DNA na fase S e permitindo o reparo (Li et al., 1996; Gramantieri et al., 2003).

Observa-se que no mecanismo de reparo celular é comum um aumento na expressão de p21 e PCNA. Nossos resultados demonstram que houve uma redução da expressão destas duas proteínas envolvidas no ciclo celular. Portanto, investigou-se a expressão de duas proteínas do processo de apoptose, uma pró-

apoptótica: a Bak e uma antiapoptótica: a Bcl2. Houve no grupo tratado com Hcy um aumento na expressão das duas proteínas, entretanto, a expressão de Bcl2 foi superior à expressão de Bak, sugerindo que possivelmente não há à apoptose pelo tratamento com Hcy. Esse comportamento celular de equilíbrio também foi observado em células do músculo liso por Buemi et al (2001), que com a adição de Hcy em concentrações de 10, 15, e 20  $\mu\text{M}$  aumentou significativamente a proliferação e a apoptose, mantendo assim um equilíbrio proliferação/apoptose.

Redução nas taxas de apoptose foi verificada nas células da crista neural em embriões de galinha (9-10HH) em que o tratamento com Hcy (30  $\mu\text{mol/L}$ ) diminuiu em 60% as taxas de apoptose (Boot et al., 2004). Para as células mesenquimais da medula óssea o tratamento com Hcy resultou num aumento de morte celular por apoptose envolvendo espécies reativas de oxigênio (ROS do inglês *reactive oxygen species*). Além disso, altos níveis de Hcy estimulam a formação de osteoclastos que promovem a reabsorção óssea (Levasseur, 2009).

Elevados níveis de Hcy (400  $\mu\text{mol/L}$ ) intensificam a apoptose em cultivo de células do trofoblasto, pelo aumento da expressão de p53 e da proteína pró-apoptótica Bak, contudo ao contrário do que verificamos, não há aumento da expressão de Bcl2 (Kamudhamas et al., 2004). O mesmo aconteceu com neurônios do hipocampo de camundongos. O tratamento com Hcy promoveu danos (rupturas dos filamentos) ao DNA, por consequência, uma disfunção na

membrana mitocondrial e a posterior ativação de caspase-3 (Kruman et al., 2000).

A via apoptótica ativada por Hcy parece ser ordenada da seguinte maneira: o dano ao DNA ativa a expressão de p53, ocorre um declínio do potencial de membrana mitocondrial, liberando citocromo c e ativando caspase-3 (Krohn, 1999). Para o nosso conjunto de dados, sugere-se, portanto, que houve danos ao DNA (aumento na expressão de p53), porém não houve mecanismo de reparo (diminuição de p21 e PCNA) nem de apoptose (aumento na expressão de Bcl2). Ao que parece, as divisões celulares não foram comprometidas, as análises de imuno-histoquímica revelaram que o tratamento com Hcy não interferiu na expressão da histona H3 (marcador mitótico).

No processo de ossificação endocondral há uma mudança na morfologia e na adesão celular, na organização do citoesqueleto e na expressão gênica. Desordens nestes mecanismos, seja por exposição a agentes teratogênicos ou por desordens genéticas, resultam em alterações no crescimento esquelético (Woods et al., 2005).

Esses precursores mesenquimais que se diferenciarão primeiramente em matriz cartilaginosa e posteriormente em matriz óssea, necessitam de um controle da expressão gênica e de um reconhecimento entre as moléculas de adesão para formação do tecido (Grogan et al., 2009). A adesão celular é crucial para a formação de tecidos a partir de células individuais. Células não

podem simplesmente "ficar" juntas para formar tecidos, precisam se organizar em padrões diversos altamente distintos. Uma variedade de mecanismos de adesão celular é responsável por manter as células unidas e, juntamente com suas conexões para o citoesqueleto, determinando a arquitetura geral do tecido. Essas unidades funcionais de adesão celular são complexos multiproteicos, que ocorrem normalmente pelas interações de glicoproteínas transmembrana com a superfície extracelular e determinam a especificidade de reconhecimento que pode ser célula-célula e/ou de reconhecimento célula-matriz extracelular. Esses receptores são as integrinas, caderinas, imunoglobulinas, selectinas, e proteoglicanos. Proteínas da MEC são geralmente glicoproteínas grandes, incluindo os colágenos, fibronectinas, lamininas, e proteoglicanos que se reúnem em fibras ou outras macromoléculas complexas (Gumbiner, 1996).

Considerando a importância das moléculas de adesão na diferenciação das células mesenquimais, nossos dados apontam uma redução significativa da expressão de VCAM-1 no grupo tratado com Hcy. Esse comportamento de redução de expressão de VCAM-1 foi verificado por Lin et al. (2007), em que elevados níveis plasmáticos de Hcy alteraram diretamente a adesão celular das células endoteliais. A expressão de VCAM-1 nestas células é importante no processo de reconhecimento e adesão com os linfócitos-T durante respostas aos processos inflamatórios (Ley et al., 2007).



Essa interação VCAM-1/linfócitos-T, verificada *in vitro*, sugere que estas moléculas podem ser importantes agentes na mediação destas interações em locais de destruição e inflamação da cartilagem articular, sugerindo a relevância das moléculas de adesão celular não só para estruturação tecidual óssea, mas também para a resposta inflamatória (Horner et al., 1995).

Em indivíduos adultos, VCAM-1 está envolvida no desenvolvimento de osteoclastos pela interação com CD44 (glicoproteína de interação célula/célula) em osteoblastos. Alterações em CD44 resultam no aumento da expressão de ICAM-1 e VCAM-1, tendo consequências para a osteoclastogênese, que é a integração dos precursores hematopoiéticos dos osteoclastos na medula óssea. Desta forma, o aumento de ICAM-1 ou VCAM-1 resulta na interação direta com os precursores dos osteoclastos, que subsequentemente, ativa a produção de citocinas que reabsorvem a matriz óssea. As moléculas de adesão da família de imunoglobulinas (ICAM-1 e VCAM-1) expressas nos osteoblastos estão firmemente implicadas na ativação da atividade de reabsorção dos osteoclastos, ou seja, houve aumento na reabsorção óssea. (Feuerbach e Feyen, 1997; Fujii et al., 2003).

O comportamento contrário à redução, o de aumento da expressão de VCAM-1, em conjunto com Notch-1 e Stro-1 nas células cartilaginosas pode implicar em alterações no desenvolvimento condrogênico. Células submetidas a exposição a elevados níveis de Hcy (0,36 e 3,6 mmol/L) tiveram a calcificação da

cartilagem prejudicada em resposta à ação conjunta do aumento da expressão de VCAM-1, da redução e desorganização da matriz de colágeno (Khan et al., 2001; Grogan et al., 2009).

Estas interações entre elevados níveis de Hcy, foram observadas em experimentos utilizando altas concentrações em embriões de galinha que apresentaram anomalias congênitas relacionadas a DTN, anomalias orofaciais e conotrunciais (van Mil et al., 2010). Testes de expressão gênica para migração e adesão celular revelaram efeito responsivo da Hcy em células da crista neural. O subconjunto destes genes que tem papel na migração e adesão celular teve sua expressão diminuída, o que conduz a anomalias estruturais (Maestro de las Casas et al., 2003; Rosenquist et al., 2007).

Existe uma relação de expressão de Sox9 e VCAM-1 na diferenciação e adesão de condrócitos na regulação da transcrição do gene que codifica o colágeno II (Woods et al., 2005). Esta relação é estabelecida, em células normais, numa expressão maior de Sox9 e VCAM-1 no início da diferenciação e, à medida que este processo segue a expressão é diminuída. Quando em situações de degeneração, ou exposição a agentes teratogênicos, estas células aumentam a expressão do gene Notch-1, envolvido no processo de proliferação celular, e reduzem ainda mais a expressão de VCAM-1 e de Sox9. Desta forma, há uma remodelação anormal da matriz cartilaginosa por conta de variações na expressão destes genes (Grogan et al., 2009; Kobus et al., 2009).

O controle da expressão gênica na diferenciação celular durante o desenvolvimento é fundamental para que as estruturas embrionárias desenvolvam-se normalmente. Para isso é necessário que esta expressão seja coordenada de acordo com a temporalidade e os níveis de expressão, ou seja, que se expressem no tempo e nos níveis certos. Este estudo investigou a expressão dos produtos gênicos de *Pax1*, *Pax9* e *Sox9* por análises de marcação por imuno-histoquímica e por citometria de fluxo. Estas demonstraram resultados diferentes: enquanto que na imuno-histoquímica a expressão de *Pax1*, *Pax9* e *Sox9* era reduzida significativamente no grupo tratado com Hcy, na citometria de fluxo *Pax9* e *Sox9* aumentaram a expressão de maneira significativa, *Pax1* não apresentou diferenças.

Comportamento de redução de expressão de *Pax1*, *Pax9* e *Sox9* em células mesenquimais foi observado por Kobus et al. (2013), onde, além disso, houve redução das taxas de proliferação celular do esclerótomo após exposição a elevados níveis de Hcy (20 $\mu$ mol) que se compara a concentração usada em nosso estudo. Este efeito de redução da expressão de *Pax1*, *Pax9* e *Sox9* gerados pela exposição a elevados níveis de Hcy é percebido por gerar alterações na condensação mesenquimal refletindo diretamente na diferenciação condrogênica e na geração de anomalias para a posterior formação da matriz óssea (Peters, 1998; Hattori et al., 2010)

*Pax1* e *Pax9* estão relacionados diretamente com o desenvolvimento da coluna vertebral, mudanças no padrão de expressão destes genes podem alterar o processo de ossificação causando a ausência de corpos vertebrais na região lombar (Strachan e Read, 1994). Além da importância para formação do esqueleto axial, *Pax1* também contribui para formação do esqueleto apendicular. Em camundongos, alterações na expressão de *Pax1* levam a anomalias na formação do osso esterno e de membros anteriores (Timmons et al., 1994).

Essa relação parece existir com *Sox9* e colágeno II, cujas alterações nas interações entre estas duas proteínas, sejam de ordem genética ou induzidas por agentes teratogênicos, podem resultar em deformidades na forma da célula e na organização do citoesqueleto. O que pode ter como consequência deformidades ou ainda retardo no crescimento esquelético (Woods et al., 2005).

Os genes *Pax1* e *Pax9* apresentam um padrão de expressão semelhante, *Pax1* em domínios mesenquimais mais proximais e *Pax9* em domínios mesenquimais mais distais. Pouco se conhece sobre as consequências decorrentes de alterações na expressão destes genes em membros, porém já se relataram alterações nas regiões de zeugópode e autópole, a exemplo da formação de dígitos supranumerários (Peters, 1998).

O comportamento de expressão *Pax1*, *Pax9* e *Sox9* nas células mesenquimais dos membros foi semelhante às células do esclerótomo, onde conforme Kobus et al (2013), houve redução na

expressão. Entretanto, este estudo demonstrou que quando analisada a expressão por citometria de fluxo houve um aumento significativo na expressão dos produtos gênicos de *Pax9* e *Sox9*. Isso pode ser explicado pelo fato de que na imuno-histoquímica a quantificação da expressão é regionalizada, ou seja, nas células da região do mesênquima mais condensado em porções autopodiais, enquanto que na citometria de fluxo têm-se todas as regiões do membro. Aliado a este fato existem locais distintos para expressão de *Pax1*, que em membros localiza-se nas porções mais proximais, mais especificamente no encontro com a parede lateral do corpo, enquanto que *Pax9* encontra-se na região de encontro do zeugópode com o autópole (Peters et al., 1995).

Além disso, dependendo da origem, padrões diferenciados de expressão destes genes podem variar nas células mesenquimais, enquanto que as células que diferenciam para formação da coluna vertebral tem origem no esclerótomo, as que originam os elementos esqueléticos em membros têm origem do mesoderma lateral (LeClair, 1999).

Estes dados sugerem que nos embriões expostos a elevados níveis de Hcy a expressão da proteína p53 aumenta e a expressão de p21 e PCNA é reduzida. Das proteínas envolvidas na apoptose, estes dados indicaram aumento na expressão da proteína Bcl2, que tem atividade antiapoptótica. Durante a diferenciação condrogênica, embriões expostos a elevados níveis de Hcy reduzem a expressão dos produtos gênicos de *Pax1*, *Pax9* e *Sox9* e

das moléculas de adesão VCAM-1. Estas alterações de adesão e diferenciação celular podem estar relacionadas com as frequências de aparecimento de anomalias congênitas em membros de embriões expostos a elevados níveis de Hcy.

Esses resultados confirmam a hipótese de que elevados níveis de Hcy podem interferir aumentando a expressão da proteína p53 e diminuindo a expressão das proteínas p21 e PCNA envolvidas no ciclo celular. Além disso, podem diminuir a expressão dos produtos gênicos de *Pax1*, *Pax9* e *Sox9* e das moléculas de adesão VCAM-1 na diferenciação condrogênica.







## 6. CONCLUSÃO

Estes dados mostram que elevados níveis de Hcy não interferem na quantidade de células em proliferação. Contudo, foram observadas alterações na expressão das proteínas envolvidas no ciclo celular, principalmente aumento na expressão da proteína p53 e redução na expressão de proteínas p21 e PCNA.

No que se refere às proteínas envolvidas no processo de apoptose, nossos dados indicam que elevados níveis de Hcy podem aumentar a expressão da proteína Bcl2 que tem atividade antiapoptótica.

Quanto à diferenciação condrogênica, elevados níveis de Hcy induziram a redução localizada da expressão dos produtos gênicos de *Pax1*, *Pax9* e *Sox9*. Além disso, houve uma redução da expressão das moléculas de adesão VCAM-1.

Estas alterações de adesão e diferenciação celular podem estar relacionadas com as frequências de aparecimento de anomalias congênitas em membros após exposição a elevados níveis de Hcy.







## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altabef, M., Tickle, C., 2002. Initiation of dorso-ventral axis during chick limb development. *Mechanisms of development* 116, 19-27.

Bentzinger, C.F., Wang, Y.X., Rudnicki, M.A., 2012. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4.

Bi, W., Deng, J.M., Zhang, Z., Behringer, R.R., de Crombrughe, B., 1999. Sox9 is required for cartilage formation. *Nature genetics* 22, 85-89.

Bi, W., Huang, W., Whitworth, D.J., Deng, J.M., Zhang, Z., Behringer, R.R., de Crombrughe, B., 2001. Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 6698-6703.

Blom, H.J., 2009. Folic acid, methylation and neural tube closure in humans. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology* 85, 295-302.

Blount, B.C., Mack, M.M., Wehr, C.M., MacGregor, J.T., Hiatt, R.A., Wang, G., Wickramasinghe, S.N., Everson, R.B., Ames, B.N., 1997. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 3290-3295.

Boot, M.J., Steegers-Theunissen, R.P., Poelmann, R.E., van Iperen, L., Gittenberger-de Groot, A.C., 2004. Cardiac outflow tract malformations in chick embryos exposed to homocysteine. *Cardiovascular research* 64, 365-373.

Buemi, M., Marino, D., Di Pasquale, G., Floccari, F., Ruello, A., Aloisi, C., Corica, F., Senatore, M., Romeo, A., Frisina, N., 2001. Effects of homocysteine on proliferation, necrosis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture and influence of folic acid. *Thrombosis research* 104, 207-213.

Camarata, T., Bimber, B., Kulisz, A., Chew, T.L., Yeung, J., Simon, H.G., 2006. LMP4 regulates Tbx5 protein subcellular localization and activity. *The Journal of cell biology* 174, 339-348.

CDC, 2008. Trends in wheat-flour fortification with folic acid and iron-worldwide, 2004 and 2007. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 57, 8-10.

Christ, B., Brand-Saberi, B., 2002. Limb muscle development. *The International journal of developmental biology* 46, 905-914.

Day, T.F., Guo, X., Garrett-Beal, L., Yang, Y., 2005. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Developmental cell* 8, 739-750.

Dean, W., Lucifero, D., Santos, F., 2005. DNA methylation in mammalian development and disease. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews* 75, 98-111.

DeLise, A.M., Fischer, L., Tuan, R.S., 2000. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 8, 309-334.

Drossopoulou, G., Lewis, K.E., Sanz-Ezquerro, J.J., Nikbakht, N., McMahon, A.P., Hofmann, C., Tickle, C., 2000. A model for anteroposterior patterning of the vertebrate limb based on sequential long- and short-range Shh signalling and Bmp signalling. *Development* 127, 1337-1348.

Dy, P., Wang, W., Bhattaram, P., Wang, Q., Wang, L., Ballock, R.T., Lefebvre, V., 2012. Sox9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes. *Developmental cell* 22, 597-609.

Ermito, S., Dinatale, A., Carrara, S., Cavaliere, A., Imbruglia, L., Recupero, S., 2009. Prenatal diagnosis of limb abnormalities: role of fetal ultrasonography. *Journal of prenatal medicine* 3, 18-22.

Eskes, T.K., 1997. Foliates and the fetus. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 71, 105-111.

- Fenech, M., Aitken, C., Rinaldi, J., 1998. Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults. *Carcinogenesis* 19, 1163-1171.
- Fernandez-Teran, M., Ros, M.A., 2008. The Apical Ectodermal Ridge: morphological aspects and signaling pathways. *The International journal of developmental biology* 52, 857-871.
- Feuerbach, D., Feyen, J.H., 1997. Expression of the cell-adhesion molecule VCAM-1 by stromal cells is necessary for osteoclastogenesis. *FEBS letters* 402, 21-24.
- Fujii, Y., Fujii, K., Nakano, K., Tanaka, Y., 2003. Crosslinking of CD44 on human osteoblastic cells upregulates ICAM-1 and VCAM-1. *FEBS letters* 539, 45-50.
- Gilbert, S.F., 2010. Developmental biology, 9.ed. ed. *Sinauer Associates*, Sunderland.
- Goh, Y.I., Bollano, E., Einarson, T.R., Koren, G., 2006. Prenatal multivitamin supplementation and rates of congenital anomalies: a meta-analysis. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada : JOGC* 28, 680-689.
- Gramantieri, L., Trerè, D., Chieco, P., Lacchini, M., Giovannini, C., Piscaglia, F., Cavallari, A., Bolondi, L., 2003. In human hepatocellular carcinoma in cirrhosis proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is involved in cell proliferation and cooperates with P21 in DNA repair. *Journal of Hepatology* 39, 997-1003.
- Grogan, S.P., Miyaki, S., Asahara, H., D'Lima, D.D., Lotz, M.K., 2009. Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes in osteoarthritis. *Arthritis research & therapy* 11, R85.
- Gumbiner, B.M., 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84, 345-357.
- Hague, W.M., 2003. Homocysteine and pregnancy. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* 17, 459-469.

Hall, B.K., Miyake, T., 2000. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 22, 138-147.

Hamburger, V., Hamilton, H.L., 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 195, 231-272.

Harfe, B.D., Scherz, P.J., Nissim, S., Tian, H., McMahon, A.P., Tabin, C.J., 2004. Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell* 118, 517-528.

Hattori, T., Muller, C., Gebhard, S., Bauer, E., Pausch, F., Schlund, B., Bosl, M.R., Hess, A., Surmann-Schmitt, C., von der Mark, H., de Crombrughe, B., von der Mark, K., 2010. SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification. *Development* 137, 901-911.

Hinchliffe, J.R., 2002. Developmental basis of limb evolution. *The International journal of developmental biology* 46, 835-845.

Hojo, H., Ohba, S., Yano, F., Chung, U.I., 2010. Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development. *Journal of bone and mineral metabolism* 28, 489-502.

Horner, A., Davies, M.E., Franz, B., 1995. Chondrocyte-peripheral blood mononuclear cell interactions: the role of ICAM-1. *Immunology* 86, 584-590.

Huhta, J.C., Hernandez-Robles, J.A., 2005. Homocysteine, folate, and congenital heart defects. *Fetal and pediatric pathology* 24, 71-79.

Ivanov, G.S., Ivanova, T., Kurash, J., Ivanov, A., Chuikov, S., Gizatullin, F., Herrera-Medina, E.M., Rauscher, F., 3rd, Reinberg, D., Barlev, N.A., 2007. Methylation-acetylation interplay activates p53 in response to DNA damage. *Molecular and cellular biology* 27, 6756-6769.



Kamudhamas, A., Pang, L., Smith, S.D., Sadovsky, Y., Nelson, D.M., 2004. Homocysteine thiolactone induces apoptosis in cultured human trophoblasts: a mechanism for homocysteine-mediated placental dysfunction? *American journal of obstetrics and gynecology* 191, 563-571.

Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., Craig, R.W., 1991. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer research* 51, 6304-6311.

Kawakami, Y., Tsuda, M., Takahashi, S., Taniguchi, N., Esteban, C.R., Zemmyo, M., Furumatsu, T., Lotz, M., Izpisua Belmonte, J.C., Asahara, H., 2005. Transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  regulates chondrogenesis via association with Sox9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2414-2419.

Khan, M., Yamauchi, M., Srisawasdi, S., Stiner, D., Doty, S., Paschalis, E.P., Boskey, A.L., 2001. Homocysteine decreases chondrocyte-mediated matrix mineralization in differentiating chick limb-bud mesenchymal cell micro-mass cultures. *Bone* 28, 387-398.

Kiefer, J.C., 2007. Back to basics: Sox genes. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 236, 2356-2366.

Kobus, K., Ammar, D., Nazari, E.M., Rauh Muller, Y.M., 2013. Homocysteine causes disruptions in spinal cord morphology and changes the expression of Pax 1/9 and Sox 9 gene products in the axial mesenchyme. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology* 97, 386-397.

Kobus, K., Nazari, E.M., Muller, Y.M., 2009. Effects of folic acid and homocysteine on spinal cord morphology of the chicken embryo. *Histochemistry and cell biology* 132, 525-532.

Krohn, A.J.W., Prehn, J.H.M., 1999. Mitochondrial depolarization is not required for neuronal apoptosis. *The Journal of Neuroscience* 19, 7394-7404.

- Kruman, Il, Culmsee, C., Chan, S.L., Kruman, Y., Guo, Z., Penix, L., Mattson, M.P., 2000. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 6920-6926.
- LeClair, E.E., 1999. Expression of the paired-box genes Pax-1 and Pax-9 in limb skeleton development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 214, 101-115.
- Levasseur, R., 2009. Bone tissue and hyperhomocysteinemia. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* 76, 234-240.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., Nourshargh, S., 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology* 7, 678-689.
- Li, F., Watkins, D., Rosenblatt, D.S., 2009. Vitamin B(12) and birth defects. *Molecular genetics and metabolism* 98, 166-172.
- Li, R., Hannon, G.J., Beach, D., Stillman, B., 1996. Subcellular distribution of p21 and PCNA in normal and repair-deficient cells following DNA damage. *Current biology : CB* 6, 189-199.
- Lin, P.Y., Yang, T.H., Lin, H.G., Hu, M.L., 2007. Synergistic effects of S-adenosylhomocysteine and homocysteine on DNA damage in a murine microglial cell line. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 379, 139-144.
- Long, F., Ornitz, D.M., 2013. Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5, a008334.
- Mackie, E.J., Ahmed, Y.A., Tatarczuch, L., Chen, K.S., Mirams, M., 2008. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40, 46-62.
- Maestro de las Casas, C., Epeldegui, M., Tudela, C., Varela-Moreiras, G., Perez-Miguelsanz, J., 2003. High exogenous homocysteine modifies eye development in early chick embryos.

*Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology* 67, 35-40.

Mandarin-de-Lacerda, C.A., 2003. Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 75, 469-486.

Mansouri, A., Hallonet, M., Gruss, P., 1996. Pax genes and their roles in cell differentiation and development. *Current opinion in cell biology* 8, 851-857.

Martin, G.R., 1998. The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes & Development* 12, 1571-1586.

Mattson, M.P., Kruman, II, Duan, W., 2002. Folic acid and homocysteine in age-related disease. *Ageing research reviews* 1, 95-111.

Oikawa, S., Murakami, K., Kawanishi, S., 2003. Oxidative damage to cellular and isolated DNA by homocysteine: implications for carcinogenesis. *Oncogene* 22, 3530-3538.

Parker, M.H., Seale, P., Rudnicki, M.A., 2003. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nature reviews. Genetics* 4, 497-507.

Peters, H., 1998. Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev* 12, 2735-2747.

Peters, H., Doll, U., Niessing, J., 1995. Differential expression of the chicken Pax-1 and Pax-9 gene: in situ hybridization and immunohistochemical analysis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 203, 1-16.

Pownall, M.E., Gustafsson, M.K., Emerson, C.P., Jr., 2002. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annual review of cell and developmental biology* 18, 747-783.

Probst, S., Kraemer, C., Demougin, P., Sheth, R., Martin, G.R., Shiratori, H., Hamada, H., Iber, D., Zeller, R., Zuniga, A., 2011. SHH propagates distal limb bud development by enhancing CYP26B1-

mediated retinoic acid clearance via AER-FGF signalling. *Development* 138, 1913-1923.

Reik, W., Dean, W., Walter, J., 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293, 1089-1093.

Rosenquist, T.H., Bennett, G.D., Brauer, P.R., Stewart, M.L., Chaudoin, T.R., Finnell, R.H., 2007. Microarray analysis of homocysteine-responsive genes in cardiac neural crest cells in vitro. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 236, 1044-1054.

Selhub, J., 1999. Homocysteine metabolism. *Annual review of nutrition* 19, 217-246.

Stevenson, R.E.H., Goodman, R. M., 1993. Human malformations and related anomalies. *Oxford University Press*, New York.

Strachan, T., Read, A.P., 1994. PAX genes. *Current opinion in genetics & development* 4, 427-438.

Tickle, C., 2004. The contribution of chicken embryology to the understanding of vertebrate limb development. *Mechanisms of development* 121, 1019-1029.

Timmons, P.M., Wallin, J., Rigby, P.W., Balling, R., 1994. Expression and function of Pax 1 during development of the pectoral girdle. *Development* 120, 2773-2785.

van Mil, N.H., Oosterbaan, A.M., Steegers-Theunissen, R.P., 2010. Teratogenicity and underlying mechanisms of homocysteine in animal models: a review. *Reprod Toxicol* 30, 520-531.

Verkleij-Hagoort, A., Bliek, J., Sayed-Tabatabaei, F., Ursem, N., Steegers, E., Steegers-Theunissen, R., 2007. Hyperhomocysteinemia and MTHFR polymorphisms in association with orofacial clefts and congenital heart defects: a meta-analysis. *American journal of medical genetics. Part A* 143A, 952-960.

Waterland, R.A., 2006. Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. *The Journal of nutrition* 136, 1706S-1710S.

Woods, A., Wang, G., Beier, F., 2005. RhoA/ROCK signaling regulates Sox9 expression and actin organization during chondrogenesis. *The Journal of biological chemistry* 280, 11626-11634.

Zeller, R., Lopez-Rios, J., Zuniga, A., 2009. Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nature reviews. Genetics* 10, 845-858.

Zhou, G., Zheng, Q., Engin, F., Munivez, E., Chen, Y., Sebald, E., Krakow, D., Lee, B., 2006. Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 19004-19009.

Zingg, J.M., Jones, P.A., 1997. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 18, 869-882.